

Université de Montréal

**Rôle de la protéine virale Vpu dans le cycle de multiplication du virus de
l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)**

par
Karine Levesque

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en microbiologie et immunologie

Août 2003

©Karine Levesque, 2003



W

4

U58

2004

V.016

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

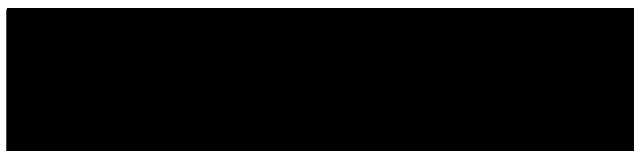
Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

« Rôle de la protéine virale Vpu dans le cycle de multiplication du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) »

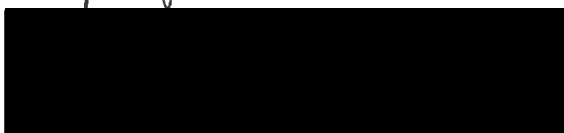
présentée par :
Karine Levesque

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :



Dr Jacques Thibodeau

président-rapporteur



Dr Eric A. Cohen

directeur de recherche



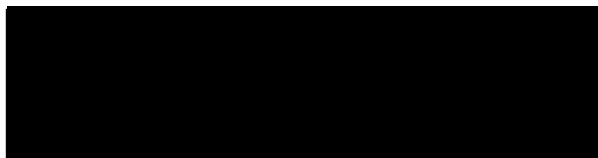
Dr Rafick-Pierre Sékaly

membre du jury



Dr Michel Tremblay

examineur externe



représentant du doyen
de la FES

Thèse acceptée le 15/1/2004

SOMMAIRE

Lors de l'infection par le VIH-1, plusieurs protéines virales, dont Vpu, entraînent une diminution importante de l'expression de surface du récepteur CD4 (109, 144). De récentes études ont permis de mettre en évidence que la diminution de l'expression de CD4 médiée par Vpu et/ou Nef joue un rôle dans la réplication virale (41, 104, 291, 437). Dans la première partie des travaux de ma thèse, nous avons pu démontrer que la dégradation de CD4 médiée par Vpu contribue à l'infektivité virale en réduisant l'expression de surface de la molécule CD4 ainsi que son incorporation dans les particules virales. En effet, en absence de Vpu, une quantité significative de CD4 se retrouve à la surface cellulaire et dans les virions entraînant ainsi la formation de complexes de haute affinité entre la glycoprotéine gp120 du virus et CD4 ce qui a pour effet de diminuer drastiquement l'infektivité virale. Finalement, nous démontrons que la diminution de l'expression de surface de CD4 induite par Vpu et Nef est requise afin d'obtenir des virions dont le potentiel infectieux est optimal dans les cellules T CD4⁺ ainsi que dans les lignées primaires, réaffirmant ainsi le rôle de ces protéines accessoires dans la propagation virale *in vivo*.

Quoique les mécanismes et le rôle de la dégradation de CD4 médiée par Vpu lors de l'infection par la VIH-1 soient mieux compris, les mécanismes sous-jacents l'augmentation de la relâche de particules virales restent à être élucidés. Des études de microscopie électronique ont démontrées qu'en absence de Vpu une grande proportion des particules virales se retrouve toujours en association avec la cellule et présentent des morphologies aberrantes (276, 562). Dans la seconde partie de mes travaux, nous nous sommes surtout intéressés à la seconde fonction de Vpu soit l'augmentation de la relâche de particules virales à partir de la cellule infectée ainsi qu'à son rôle dans la morphogénèse virale. Nous avons pu démontrer par microscopie électronique à balayage que des virus mutés pour Vpu forment de larges agrégats attachés à la surface cellulaire. La présence de ces agrégats est indépendante de l'expression de CD4 et est directement liée à la capacité de Vpu à faciliter le bourgeonnement des particules virales. Donc, dans l'ensemble, nos résultats

suggèrent fortement que Vpu contribue à l'infection et à la pathogénèse du VIH-1 en optimisant la relâche et l'infectivité des particules virales.

Finalement, la dernière partie de mes travaux porte sur la molécule CD4. La molécule CD4 est une glycoprotéine composée de 4 domaines extracellulaires (D1 à D4), d'une région transmembranaire et d'une courte queue intracytoplasmique (352). La structure cristallographique de D1 à D4 de la molécule prédit un site d'homodimérisation situé en D4 (556). Outre ses fonctions lors de la réponse immunitaire, CD4 a été identifié comme étant un des principaux récepteurs du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) (326). Des conditions ont été mises au point afin de visualiser des formes multimériques de CD4 *in vivo*. Ces conditions ont également permis d'établir que p56^{lck} interagit avec la forme dimérique et/ou monomérique de CD4. Des études de mutagenèse du domaine D4 de CD4 réalisées dans le laboratoire du Dr Sékaly indiquent que ce site contribue à la dimérisation de la molécule, confirmant ainsi les études cristallographiques. De ce fait, des études fonctionnelles ont été amorcées afin de vérifier l'importance de la dimérisation de CD4 lors de l'infection par le VIH-1. Des délais substantiels de réplication du virus sont obtenus lors de l'infection des lignées exprimant des mutants de dimérisation de CD4. Par conséquent, ces études pourraient éventuellement contribuer au développement d'approches pratiques permettant de mieux contrôler la réplication du VIH-I et ses conséquences pathogéniques.

Mots-clés : VIH-1, Vpu, Nef, récepteur CD4, infectivité virale, propagation virale, interaction Env/CD4, morphogénèse virale, relâche facilitée, dégradation de CD4.

SUMMARY

In the course of HIV-1 infection, several proteins, including Vpu, contribute to CD4 cell surface down-modulation (109, 144). Recent studies have shown that this inhibition of CD4 cell surface expression mediated by Vpu and/or Nef plays a key role during viral replication suggesting that CD4 could represent an important regulator of HIV-1 pathogenesis (41, 104, 291, 437). In the first part of my work, we show that Vpu-mediated CD4 degradation modulates positively HIV-1 infectivity by reducing the level of CD4 molecules expressed at the cell surface thereby reducing its incorporation into virions. Indeed, in the absence of Vpu, significant amount of CD4 is found at the cell surface and associated with virions. Accumulation of CD4 molecules in HIV-1 particles exerts a negative effect on viral infectivity most likely by promoting the formation of non-functional gp120/CD4 complexes at the virion surface. Finally, we show that both Vpu and Nef-induced CD4 down-modulation activities are required for production of fully infectious particles in CD4⁺ T cell lines and primary cells, an observation that has clear implication for viral spread *in vivo*.

Although the mechanism and the role of Vpu mediated CD4 down-modulation is better understood, the mechanism underlying the facilitation of virion release still remains to be defined. Electron microscopic studies have revealed that Vpu-defective viral particles have aberrant morphologies. Indeed, large proportions of viral particles are still tethered to the cell surface and exhibit significant variations in size and morphology sometimes leading to multiple core particles (276, 562). In the second part of my thesis, we were interested in better defining the second function of Vpu, the facilitation of virion release, and its role in virion morphogenesis. Using transient proviral expression assay in 293T cells and scanning electron microscopy, we show that Vpu-defective virus form large viral aggregates tethered at the cell surface. The presence of these viral aggregates is independent of CD4 expression. Moreover, using different Vpu release mutants that still maintain their ability to degrade CD4, we show that the appearance of this morphology defect directly correlates with Vpu's ability to facilitate virus particle release. Taken

together, our results strongly indicate that Vpu contributes to HIV-1 replication and pathogenesis by optimizing the release of fully infectious particles.

Finally, the last part of my thesis focuses on the CD4 molecule. CD4 is a 55 kDa glycoprotein expressed mainly at the surface of T cells and monocytes/macrophages. It consists of four extracellular domains (D1 to D4), a membrane-spanning region and a short cytoplasmic tail (352). The crystal structure of CD4 predicts a dimerization site located in the D4 domain of the molecule (556). Aside from its role during the immunological response, CD4 has been identified as one of the primary receptor of HIV-1 (326). Non-denaturing conditions have been used to visualise oligomeric forms of CD4 *in vivo*. These conditions allowed us to establish that p56^{lck} interacts with the dimeric and/or the monomeric form of CD4. Mutagenesis analysis of the D4 domain of CD4 performed in Dr Sékaly laboratory indicates that this site is critical for dimer formation as predicted by the crystal structure (556). Functional studies were performed to determine the physiological relevance of CD4 dimerization in the course of HIV-1 infection. A substantial delay of viral replication was observed when T cells expressing CD4 dimer mutant were infected. Consequently, these studies could eventually lead to the development of practical approaches allowing a better control of HIV replication and its pathogenic consequences.

Keyword : HIV-1, Vpu, Nef, CD4 receptor, viral infectivity, Env/CD4 interaction, viral spread, viral morphogenesis, CD4 down-modulation, facilitation of virion release.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
Page titre	i
Identification du jury	ii
Sommaire	iii
Summary	v
Table des matières	vii
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xiv
Remerciements	xx

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE	1
1. SIDA	2
1.1 Découverte et origine	2
1.2 Épidémiologie	3
1.3 Histoire naturelle de la maladie	3
2. VIH-1 : un rétrovirus	7
2.1 Classification et organisation génétique	7
2.2 Structure et composition de la particule virale	8
3. Cycle de multiplication du virus	10
4. Entrée du VIH-1 dans la cellule cible	12
4.1 Récepteurs cellulaires et tropisme	12
4.1.1 Le récepteur CD4	12
4.1.1.1 Structure de la molécule CD4	12
4.1.1.2 Fonctions du récepteur CD4	14
4.1.1.3 Effet du VIH-1 sur l'expression du récepteur CD4	15
4.1.2 Les récepteurs de chimiokines	18
4.1.2.1 Structure et fonctions	18
4.1.2.2 Rôle dans l'infection et la pathogenèse du VIH-1 ..	19
4.2 Mécanisme moléculaire de l'entrée	21
4.2.1 Reconnaissance du récepteur	21

4.2.2	Rôle des radeaux lipidiques dans l'entrée	22
4.2.3	Fusion.....	24
4.2.4	Décapsidation	25
5.	Étapes de pré-intégration	25
5.1	Rétrotranscription	26
5.2	Transport nucléaire du complexe de pré-intégration	29
5.3	Intégration du génome viral	30
6.	Étapes de post-intégration : régulation de l'expression des gènes	31
6.1	Rôle de Tat dans la transcription	31
6.2	Épissage des ARNm	32
6.3	Rôle de Rev dans l'export des ARNm vers le cytoplasme	33
7.	Protéines structurales	34
7.1	Synthèse des précurseurs Gag et GagPol	34
7.2	Structure et maturation de Env	35
8.	Assemblage et bourgeonnement de la particule virale	37
8.1	Ciblage au site d'assemblage	37
8.1.1	Domaine M	37
8.2	Oligomérisation de Gag	38
8.2.1	Domaines de multimérisation de Gag	38
8.3	Encapsidation de l'ARN génomique	40
8.4	Incorporation de protéines cellulaires	41
8.5	Convergence Env/Gag	43
8.6	Bourgeonnement	44
8.7	Maturation	46
9.	Protéines accessoires : Vif, Vpr/Vpx et Nef	46
9.1	Vif	47
9.2	Vpr/Vpx	48
9.3	Nef	50

10. Vpu	52
10.1 Expression et structure	52
10.2 Fonctions	55
10.2.1 Dégradation du récepteur CD4	55
10.2.2 Augmentation de la relâche de particules virales	57
10.2.3 Vpu : un canal ionique ?	58
10.2.4 Effets cytopathiques sur la cellule	60
10.2.4.1 Formation de syncytium	60
10.2.4.2 Induction de l'apoptose	61
10.2.5 Vpu et la pathogénèse associée au VIH-1	61
11. Problématique et objectifs	62
 CHAPITRE 2	
MATÉRIEL ET MÉTHODES	65
1. Biologie cellulaire	66
1.1 Culture cellulaire	66
1.1.1 Lignées cellulaires adhérentes	66
1.1.2 Lignées cellulaires en suspension	67
1.1.3 Cellules primaires	67
1.2 Transfections	68
1.2.1 Précipité de phosphate de calcium	68
1.2.2 DEAE-dextran	68
1.3 Analyse de cytométrie en flux	69
1.4 Microscopie électronique par balayage	69
2. Génie génétique	70
3. Plasmides et vecteurs d'expression	70
3.1 Expresseurs de CD4	70
3.2 Clones moléculaires de VIH-1	71
3.3 Autres vecteurs d'expression	71
4. Virologie	71
4.1 Productions virales	71
4.1.1 Coussin de sucrose	72
4.1.2 Gradient de sucrose	72

4.2	Essai de transcriptase inverse	73
4.3	Étude de réplication virale et infections	73
4.4	Essais d'infectivité	74
4.4.1	Essai MAGI	74
4.4.2	Essai luciférase	75
5.	Analyse des protéines	75
5.1	Anticorps	75
5.2	Marquage métabolique des cellules	76
5.3	Immunoprécipitation	76
5.3.1	Analyse des protéines associées à la particule virale	76
5.3.2	Analyse biochimique de la formation de dimères de CD4 ..	77
5.4	Immunobuvardage	77

CHAPITRE 3

Étude du rôle de la dégradation du récepteur CD4 médiée par Vpu dans le cycle de réplication du VIH-1

79

1.	Préambule	80
2.	Résultats	81
2.1	La dégradation du récepteur CD4 médiée par Vpu permet de rétablir l'effet négatif de l'expression de CD4 à la surface de la cellule sur l'infectivité virale	81
2.2	Vpu module positivement l'infectivité des particules virales du VIH-1 produites dans les lignées de cellules T et les PBMCs ...	83
2.3	L'incorporation de CD4 dans les virions interfère avec le niveau d'enveloppe fonctionnelle associée à la particule virale du VIH-1	86
2.4	La diminution de l'expression de surface de CD4 induite par les activités de Vpu et Nef est requise afin que le VIH-1 ait un potentiel infectieux optimal	94

CHAPITRE 4

Étude du rôle de Vpu dans la morphogénèse virale et son importance dans le processus de relâche facilitée des particules virales

97

1. Préambule	98
2. Résultats	98
2.1 La protéine Vpu du VIH-1 influence la morphogenèse virale indépendamment de l'expression de CD4	98
2.2 Vpu, par sa fonction de relâche facilitée des virions, influence la morphogenèse du VIH-1	102
2.3 Les virions attachés à la surface de la cellule possèdent la même densité que les particules virales relâchées	105
2.4 Les aberrations morphologiques observées en absence de Vpu permettent une meilleure adsorption du virus à la cellule cible	107
2.5 L'accumulation de particules virales à la surface de la cellule en absence de Vpu facilite la transmission virale de cellules à cellules et favorise l'apparition des effets cytopathiques	110
 CHAPITRE 5	
Études des implications fonctionnelles de la dimérisation de la molécule CD4 lors de l'infection par le VIH-1	115
1. Préambule	116
2. Résultats	117
2.1 La molécule CD4 existe sous forme homo-oligomérique	117
2.2 La dimérisation de la molécule CD4 semble être importante pour la réplication du VIH-1	118
 CHAPITRE 6	
Discussion et conclusion	122
 CHAPITRE 7	
Bibliographie	139
 ANNEXE 1	 182
ANNEXE 2	191

Liste des figures

Chapitre 1

	Page
Figure 1. Représentation schématique de la progression de la maladie induite lors de l'infection par le VIH-1	5
Figure 2. Le VIH-1 : Organisation génomique et structure de la particule virale..	9
Figure 3. Cycle de réplication du VIH-1	11
Figure 4. Structure du récepteur CD4	13
Figure 5. Diminution de l'expression de surface de la molécule CD4 lors de l'infection par le VIH-1	17
Figure 6. Mécanisme moléculaire de l'entrée du VIH-1	23
Figure 7. Mécanisme moléculaire de la transcription inverse du génome rétroviral	28
Figure 8. Modèle hypothétique de la structure de Vpu	54

Chapitre 3

Figure 1. La diminution de l'expression de surface de CD4 induite par Vpu exerce un effet positif sur l'infectivité du VIH-1.....	84
Figure 2. Vpu module positivement l'infectivité des particules virales du VIH-1 produites dans la lignée cellulaire MT4 et les cellules primaires PBMCs.....	87
Figure 3. La diminution de l'expression de surface de CD4 et de son incorporation dans les virions contribue à l'infectivité du VIH-1 en augmentant le niveau d'Env fonctionnelle présent à la surface de la particule virale	89
Figure 4. Analyse des particules virales produites dans les cellules MT4.....	92
Figure 5. Effet de la diminution de l'expression de surface de CD4 induite par Vpu et Nef sur l'infectivité du VIH-1.....	96

Chapitre 4

Figure 1. La protéine Vpu du VIH-1 influence la morphogénèse virale.....	100
Figure 2. Vpu influence la morphogénèse virale indépendamment de l'expression de CD4.....	101
Figure 3. Séquence et phénotypes de différents mutants de Vpu.....	103
Figure 4. Vpu, par sa fonction de relâche facilitée des virions, influence la morphogénèse du VIH-1	104
Figure 5. Les virions attachés à la surface de la cellule possèdent la même densité que les particules virales relâchées	106
Figure 6. Les aberrations morphologiques observées en absence de Vpu permettent une meilleure adsorption du virus à la cellule cible	109
Figure 7. L'accumulation de particules virales à la surface de la cellule en absence de Vpu facilite la transmission virale de cellules à cellules et favorise l'apparition des effets cytopathiques	113

Chapitre 5

Figure 1. La molécule CD4 existe sous forme monomérique, dimérique et tétramérique.....	120
Figure 2. La dimérisation de la molécule CD4 semble être importante pour la réplication du VIH-1	121

Chapitre 6

Figure 1. Différents modèles expliquant comment la protéolyse du récepteur CD4 contribue à l'infectivité du VIH-1	138
--	-----

Liste des abréviations

a.a.	acide aminé
ADN, ADNc	acide déoxyribonucléique, complémentaire
APOBEC3G	déaminase de l'ADN
ARN, ARNm, ARNt	acide ribonucléique, messenger, de transfert
ARNt ^{Lys}	acide ribonucléique de transfert Lysine
AZT	3-azido-3-déoxythymidine
α	alpha
BFA	Brefeldin A
BSA	« bovine serum albumin » ou albumine de sérum bovin
β	beta
β -gal	beta-galactosidase
β -TrCP	composante de spécificité du complexe ubiquitine ligase E3
C1 à C5	domaines conservés de Env
°C	degré celcius
CA	protéine de la capside
CD4	protéine membranaire des cellules T auxiliaires
CD8	protéine membranaire des cellules T cytotoxiques
CDC	« Center for Disease Control » ou centre de contrôle des maladies
CDR2	« complementary determining region »
CMH-I, II	complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, II
CMV	cytomégalovirus
cpz	chimpanzé
cpm	coup par minute
CO ₂	dioxyde de carbone
Crm1	exportine-1; protéine impliquée dans l'exportation nucléaire de macromolécules
D1 à D4	domaines extracellulaires de CD4 (1 à 4)

DLS	« dimer linkage sequence » ou séquence de dimérisation
DMEM	« Dulbecco's modified Eagle medium »
DMSO	sulfoxyde de diméthyle
dNTP	déoxynucléoside triphosphate
DOC	sel de l'acide déoxycholique
DTT	dithiotréitol
Δ	delta
E2	« ubiquitin-conjugating enzyme » protéine impliquée dans l'ubiquitination des protéines
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
EGTA	éthylène glycol-bis (acide b-aminoethyl éther N,N,N',N',-tétraacétique)
Env	enveloppe virale
ESCRT-1	« endosomal sorting complex required for transport-1 »; complexe protéique impliqué dans le transport vésiculaire
FACS	« fluorescence-activated cell sorter » (marque déposée de Becton Dickinson)
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
G2	étape de la division cellulaire précédant la mitose
Gag	« group antigen »; précurseur des protéines structurales du virus
GFP	« green florescent protein » ou protéine fluorescente verte
gp41	glycoprotéine 41 de l'enveloppe (transmembranaire)
gp120	glycoprotéine 120 de l'enveloppe (surface)
gp160	glycoprotéine 160 de l'enveloppe (précurseur)
GSH	gluthatione réduit
h.	heure
^3H	isotope 3 de l'hydrogène

HA	hémagglutinine
HANC	« hyperpolarisation-activated non specific cation current »
HAT	histone-acétyl-transférase
HHR23A	protéine de la machinerie de réparation de l'ADN
HTLV-I, -II, -III	virus de la leucémie T humaine de type 1, 2, 3
Hsp70	« heat shock protein 70 »; chaperone cellulaire
ICAM-1	«intercellular adhesion molecule-1» ou molécule d'adhésion intercellulaire-1
Ig	immunoglobuline
IL-2	interleukine-2
IN	intégrase
kb	kilobase
kDa	kilodalton
KCl	chlorure de potassium
kV	kilovolt
κ	kappa
LAV	« lymphadenopathy-associated virus »
LTR	« long terminal repeat » ou longue terminaison répétée
M	molaire
MA	protéine de la matrice
MAGI	« multinuclear activation of galactosidase indicator cells »
2-ME	2-β-mercaptoéthanol
MgCl ₂	chlorure de magnésium
MgSO ₄	sulfate de magnésium
MHR	« major homology domain » ou domaine majeur d'homologie
MLV	virus de la leucémie murine
ml	millilitre
mm	millimètre

mM	millimolaire
M.O.I.	«multiplicity of infection» ou multiplicité d'infection
MoMuLV	virus Moloney de la leucémie murine
MVB	« multivesicular bodies »
μ	micro
μCi	microcurie
μg	microgramme
μl	microlitre
μm	micromètre
μM	micromolaire
NaCl	chlorure de sodium
NaH ₂ PO ₄	phosphate de sodium monobasique
Na ₂ HPO ₄	phosphate de sodium dibasique
NC	protéine de la nucléocapside
Nef	«negative regulatory factor»
NES	« nuclear export signal » ou signal d'exportation nucléaire
NF-κB	« nuclear factor-κB » ou facteur nucléaire-κB
NLS	« nuclear localization signal » ou signal de localisation nucléaire
NSI	« non-syncytia inducing » ou non-inducteur de syncytium
O.M.S.	organisation mondiale de la santé
p6, p7, p17, p24	protéines de Gag matures; p6, p7 (nucléocapside), p17 (matrice), p24 (capside)
p51, p66	sous-unités de la transcriptase inverse virale
PAGE	« polyacrylamide gel electrophoresis »
PBMC	« peripheral blood mononuclear cells » ou cellules mononuclées du sang périphérique
PBS	« primer binding site » ou site d'attachement de l'amorce

PBS	« phosphate-buffered saline » ou solution saline
pH	constante d'acidité
PIC	« preintegration complex » ou complexe de préintégration
P.P.T.	« polypurine tract » ou région riche en purines
Pol	polymérase
poly(rA)-Oligo(dT)	« polyadenylic acid pentadecathymidylic acid »
Pr55 ^{Gag} , p55	précurseur polyprotéique Gag
Pr160 ^{GagPol}	précurseur polyprotéique GagPol
PR	protéase
P-TEFb	«positive transcription elongation factor-b » ou facteur positif de l'élongation de la transcription-b
%	pourcent
R	région répétée du LTR
RE	réticulum endoplasmique
Rev	«regulator of expression of virion protein»
RIPA	«radioimmune precipitation assay» ou tampon de lyse pour radioimmunoprécipitation
RMN	résonnance magnétique nucléaire
Rnase	ribonucléase
rpm	révolution par minute
RRE	« Rev responsive element »
RT	« reverse transcriptase » ou transcriptase inverse
35 ^S	isotope 35 du soufre
SCID	« severe combined immunodeficient »
SDS	sulfate dodécyle de sodium
SFV	sérum foetal de veau
SHIV	virus chimère de l'immunodéficience humaine et simienne
SI	« syncytia-inducing » ou inducteur de syncytium
SIDA	syndrome de l'immunodéficience acquise

Skp1-p	protéine faisant partie du complexe ubiquitine ligase E3
SL1 à SL4	« stem loop 1 to 4 » ou tige boucle 1 à 4
Sp1	« stimulatory protein 1 » ou protéine stimulatrice 1
SU	protéine de surface
TAR	« trans-activation response element » ou élément de réponse à la transactivation
Tat	« transactivator of transcription » ou transactivateur de la transcription
TBS	« tris-buffered salt » ou tampon salin
TCA	acide trichloro-acétique
TE	tris-EDTA
TFIIB	« transcription factor IIB » ou facteur de transcription IIB
TM	protéine transmembranaire
Tsg101	sous-unité de ESCRT-1
U3	extrémité unique 3'
U5	extrémité unique 5'
UBP	« Vpu-binding protein »
UDG	uracile glycosylase
UV	ultraviolet
V	Volt
V1 à V5	régions variables de V1 à V5 de l'Env
Vif	« viral infectivity factor »
VIH-1, -2	virus de l'immunodéficience humaine de type 1, 2
VIS	virus de l'immunodéficience simienne
Vpr	« viral protein R »
Vpu	« viral protein U »
Vpx	« viral protein X »
VSV	virus de la stomatite vésiculaire
VSV-G	glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire
ψ	psi

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr Éric A. Cohen, qui a rendu possible l'élaboration et la réalisation de cette thèse. Outre le fait de m'avoir accepté au sein de son laboratoire et d'avoir supervisé mes travaux tout au long de ces années, Éric n'a jamais cessé de croire en mes capacités et ce, malgré les difficultés. En effet, si j'ai réussi à mener à terme ce projet, c'est en partie grâce à Éric qui, par sa patience exemplaire, a toujours su me convaincre qu'à force de persévérance on pouvait y arriver et que les difficultés ne sont jamais insurmontables. Également, à ses côtés, j'ai appris le sens de la rigueur ainsi que celui de l'intégrité scientifique. Finalement, je le remercie d'avoir accepté mes implications au sein de divers projets parascolaires dont l'association étudiante et le projet SEUR.

Évidemment, il va s'en dire qu'au cours de mes études, de nombreuses personnes ont collaboré de près ou de loin à la réussite de ce projet. Ainsi, dans un premier temps, je remercie Yongsen Zhao avec qui j'ai pu collaborer pour le projet concernant le rôle de Vpu dans l'infectivité viral ainsi que Linda Mark avec qui j'ai collaboré sur le projet de l'implication de Vpu dans la morphogénèse virale. Aussi, j'aimerais remercier Maria-Cristina Moldovan, Abdelkader Yachou pour leur disponibilité ainsi que le Dr Rafick-Pierre Sékaly pour m'avoir permis de collaborer avec eux sur le projet de dimérisation de CD4.

Outre ces personnes, je tiens à chaleureusement remercier Johanne Mercier, avec qui j'ai eu la chance de travailler sur le projet CD4 et qui aujourd'hui, avec Rachel Bourgeois en assure la relève. Par ailleurs, je remercie également Johanne ainsi que Nicole Rougeau pour tout le support technique qu'elles apportent au laboratoire.

Now, I would like to address a special thank to Dr Xiao-Jian Yao who was always available to answer my numerous questions and whose advices were always helpful (Don't forget, you are my favourite Chinese man!). I would also like to acknowledge Young Xiao and Zhujun Ao for their kindness; don't give up, the end of a PhD does exist ;-). Je remercie tous les collègues de travail de jadis pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont offert à mon arrivée au laboratoire ainsi que les collègues de

travail actuels pour leur présence et leur soutien moral. Merci Andrès dit le mexicain, Maud, Daniel, Charles, Manuela, Mélanie, Julie, Geneviève et Ghyslaine. Un merci particulier à l'équipe du Dr Jacques Thibodeau pour leur support technico-informatique...Grâce à Francis et à Hayssam, je sais maintenant utiliser Power Point! Évidemment, il m'est impossible d'oublier les deux Alexandre. Alexandre Brunet, le grand colosse du département toujours prêt à venir à ma rescousse. Merci grand frère! Et finalement, Alexandre Ostiguy, ma comète chauve préférée, merci pour tous les moments passés ensembles, le jogging (oui, tu cours plus vite que moi!), le vélo (bon, tu pédales aussi plus fort que moi!), les bouffes (cuisines-tu vraiment mieux que moi ?) et j'en passe. Mais une chose est certaine, je pleure définitivement mieux que toi! Enfin bref, simplement merci d'avoir été là pour moi.

Finalement, je tiens à remercier ma famille et mes amis qui m'ont toujours supportée dans ce projet et ont toujours été présents pour moi. Merci à mes parents, Robert, Georgette, Emanuelle, Pierre-Olivier, Julien, Édith (amie sage et fidèle), Martin (WNGTIA !), Renaud (ma grenouille), Dominic (continues de bouger l'épaule quand tu joues de la guitare, t'es beau), Anik (merci pour ta musique), Anne-Marie (ma plombière adorée), Julie (Cepsum demain 7 heures, c'est promis... mmm peut-être pas finalement!), Annie, Katell, Patrick et Tony. Également, merci à Pierre-Olivier et longue vie aux Têtes Brûlées! Et vraiment finalement, j'aimerais remercier Théophane, mon copain, pour son sourire, sa présence, son dévouement mais surtout pour m'avoir attendue. Même si parfois tu m'essouffles un peu, sans toi la vie n'aurait sans doute pas la même couleur.

Chapitre 1

Revue de littérature

1. SIDA

1.1 Découverte et origine

Les premières publications médicales concernant ce qui allait être connu quelques années plus tard comme étant le Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA) parurent en 1981 (209, 346, 481). On y rapportait de nombreux cas de pathologies rares dont des pneumopathies causées par *Pneumocystis carinii* et des cas de syndrome de Kaposi (72, 73). Outre la rareté de ces manifestations pathologiques, leur apparition préférentielle au sein de la communauté homosexuelle masculine était remarquable. Plus encore, en dehors de toutes causes évidentes, tous les cas décrits survenaient chez des personnes atteintes d'un déficit immunitaire sévère. L'état accompagnant cette immunodéficience fut défini par le Center for Disease Control (CDC) comme étant le SIDA.

En quelques mois, le caractère épidémique de ces manifestations infectieuses ne faisait plus de doute. En effet, au début de l'année 1982, on dénombrait plus de 200 cas de syndrome de Kaposi (71, 231). À cette même période, l'hypothèse d'un agent transmissible sexuellement ou par contamination sanguine était sérieusement envisagée. L'existence d'un tel agent venait expliquer l'émergence de cas de SIDA non seulement au sein de la communauté homosexuelle mais aussi chez les hétérosexuels (aux Caraïbes et en Afrique), les utilisateurs de drogue intraveineuse et les hémophiles transfusés (74, 75, 76, 406, 530).

Dès 1983, apparaissait le premier indice suggérant qu'un rétrovirus pouvait être l'agent étiologique du SIDA (21). C'est à l'institut Pasteur en France, que l'équipe du Dr Montagnier isolait à partir de ganglions lymphatiques d'un patient présentant une immunodéficience sévère un rétrovirus qui fut nommé LAV (Lymphadenopathy-associated virus). Au cours de la même année, une équipe américaine sous la direction du Dr Gallo réussissait également à isoler un rétrovirus à partir de sérum de patients sidatiques. Ce virus, apparenté à d'autres rétrovirus causant des lymphomes de cellules T, fut nommé HTLV-III (185, 197). Ce n'est que plus tard, que la similarité de la séquence nucléotidique du LAV et du HTLV-III suggéra que ces virus étaient associés au SIDA. En 1986, le comité international de taxonomie recommanda que le virus responsable du SIDA prenne l'appellation de

virus de l'immunodéficience humaine ou VIH (95, 96). Peu après la découverte du VIH de type 1 (VIH-1), le VIH de type 2 était identifié en Afrique de l'ouest (264). Toutefois, des différences notables existent quant à la pathogenèse et à l'épidémiologie des deux sous-types (93, 399).

1.2 Épidémiologie

Des analyses phylogénétiques ont permis de clairement établir qu'une transmission inter-espèce du singe vers l'homme est à l'origine du VIH (187, 225, 476). À cet effet, dès 1959, il existe des évidences documentées de la présence du virus dans le sérum d'un homme africain (368). Depuis le début de l'épidémie, l'organisation mondiale de la santé estime à plus de 42 millions le nombre de personnes infectées par le VIH à travers le monde et à environ 3,1 millions le nombre de décès liés au SIDA en 2002. On évalue à environ 16 000 le nombre de personnes infectées quotidiennement. Plus de 90% de ces infections ont lieu dans des pays en voie de développement. Malgré que le taux de morbidité liée à l'infection au VIH ait diminué avec l'avènement des multithérapies, il n'en demeure pas moins que l'épidémie subsiste et que son ampleur constitue une réalité dramatique en Afrique, en Asie du Sud et du Sud-Est ainsi que dans les pays de l'Europe de l'est. En effet, il existe de grandes inégalités quant à l'accessibilité aux traitements entre les pays du Nord et les pays du Sud (156). Ainsi, la lutte contre le SIDA ne doit pas se limiter aux aspects thérapeutiques mais doit aussi prendre en compte une approche préventive dans les pays en voie de développement afin de fournir aux populations atteintes un minimum de prise en charge.

1.3 Histoire naturelle de la maladie

L'infection par le VIH se caractérise par une dégénérescence lente et progressive des systèmes immunitaire et nerveux central (296). Le VIH infecte principalement les lymphocytes T et les macrophages mais peut également infecter d'autres types cellulaires dont les cellules nerveuses et les cellules épithéliales intestinales (91, 275, 326). L'évolution spontanée de l'infection par le VIH est

divisée en trois phases soit la phase aiguë ou primo-infection, la phase asymptomatique et la phase symptomatique (SIDA) (Fig. 1).

La phase aiguë chez les individus infectés est caractérisée par l'apparition de symptômes apparentés à ceux de la grippe ou de la mononucléose (103). La sévérité et la persistance de ces manifestations survenant dans les premières semaines suivant l'infection varient de façon considérable d'un individu à l'autre. Au cours de la primo-infection, le virus se réplique intensément dans les lymphocytes T CD4⁺. Conséquemment, au cours de cette période, on observe une virémie importante (de 10⁶ à 10⁷ particules virales par ml de sang) et une antigénémie p24 détectable au niveau des fluides sanguins et cérébro-spinal (92, 241, 518). Par ailleurs, on remarque également une diminution drastique du nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants (182) dont l'origine serait leur séquestration dans les organes lymphoïdes où siège la réponse immune anti-VIH (158, 306). En effet, suite à l'infection initiale, il se produit, en quelques semaines, une intense réaction immunitaire de l'hôte contre le virus, caractérisée par l'apparition d'anticorps anti-VIH et par une forte réponse T cytotoxique (240). L'efficacité de la réponse immune semble permettre l'élimination de l'essentiel de la charge virale puisqu'en moins de 3 mois, on observe une chute drastique de l'antigénémie p24 ainsi qu'une stabilisation du nombre de lymphocytes T CD4⁺. Toutefois, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ ne reviendra jamais à son niveau initial. L'autre conséquence du déclenchement d'une réponse immunitaire spécifique est la disparition des symptômes cliniques d'où l'entrée en phase asymptomatique.

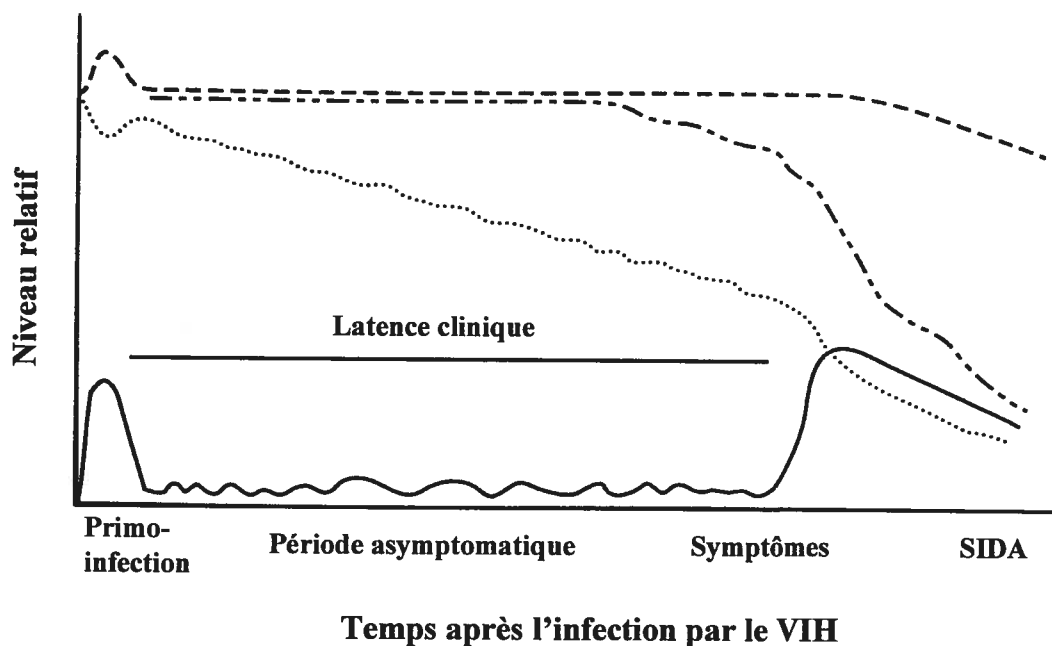


Figure 1. Représentation schématique de la progression de la maladie induite par le VIH-1. Malgré que la charge virale sanguine demeure indétectable tout au long de la période asymptomatique, le virus reste présent dans l'organisme et se réplique intensément engendrant un déclin constant du nombre des lymphocytes T CD4⁺. Lorsque la balance entre l'élimination des cellules T CD4⁺ infectées et la régénération des cellules lymphocytaires par l'organisme est perturbée, l'individu infecté passe alors en phase symptomatique de la maladie appelée SIDA. Charge virale (—), nombre de cellules CD4⁺ (.....), nombre de cellules CD8⁺ (-----), réponse immunitaire cytotoxique (— — — —). Adapté de J.A.Levy. 1998. HIV and the pathogenesis of AIDS. 2^e édition. p.318.

Cette phase asymptomatique de durée variable, peut s'échelonner sur une période de 8 à 10 ans, voire plus pour les sujets asymptomatiques à long terme (302, 520). Durant cette période, quoique l'individu infecté ne montre aucun signe de maladie, le virus reste toutefois présent dans l'organisme, particulièrement dans les organes lymphoïdes. Ainsi, la période asymptomatique représente davantage une période de latence clinique qu'une période de latence virale. En effet, il est maintenant admis que le virus continue de se répliquer activement dans ces organes et que sa diffusion soit probablement en partie réprimée par les réponses humorales et cellulaires cytotoxiques qui restent maximales pendant toute cette période (143, 242, 306, 391, 401, 539). Ainsi, on pourrait définir la phase asymptomatique comme un état d'équilibre dynamique entre une réplication virale intense et une réponse immunitaire relativement efficace (242). Lorsque la balance précaire entre l'élimination des cellules T CD4⁺ infectées et la régénération des cellules par l'organisme est perturbée, l'individu passe alors à la phase symptomatique de la maladie.

Au moment de la phase symptomatique, la dissémination du virus dans l'organisme ainsi que le déficit immunitaire atteignent alors leur paroxysme. Le niveau de lymphocytes T CD4⁺ circulants se situe sous les 200 cellules/ μ l. Cette diminution importante du nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants corrèle avec une augmentation de la charge virale dans le sang : pronostic du développement du SIDA et de la mort éventuelle du patient (157). En effet, on assiste chez l'individu infecté à l'apparition de micro-organismes opportunistes tels les protozoaires *Pneumocystis carinii* et *Toxoplasma gondii* ainsi qu'à l'émergence de néoplasie tel le syndrome de Kaposi. La valeur prédictive du niveau de cellules T CD4⁺ et de la charge virale plasmodique a été largement démontrée et sert de pronostic de la sévérité et de la vitesse de progression de la maladie (351).

L'évolution lente et prolongée de la maladie est aujourd'hui expliquée en partie par l'établissement de réservoirs latents. Au cours de son cycle répliatif, le VIH, comme les autres rétrovirus, doit intégrer son ADN proviral au génome cellulaire. Conséquemment, le métabolisme ainsi que l'état d'activation de la cellule

infectée seront corollaires de la longévité de l'ADN proviral puisqu'influençant directement la durée de vie de la cellule. Ainsi, les cellules T CD4⁺ quiescentes ainsi que les macrophages ont pu être identifiés comme étant des réservoirs contribuant à la dissémination du virus (90). En fait, la présence de ces réservoirs latents est davantage mis en évidence par des études effectuées chez des patients sous trithérapies. Malgré qu'ayant une virémie indétectable, il est possible de rétablir la réplication à de hauts niveaux lorsque le traitement est arrêté (89). Ainsi, à présent, de nombreux efforts sont investis afin d'éradiquer ces réservoirs qui à prime abord, semblent résister aux traitements anti-viraux ainsi qu'à la forte réponse immunitaire anti-VIH.

2. VIH-1 : un rétrovirus

2.1 Classification et organisation génétique

Le VIH appartient à la famille des Retroviridae. Les rétrovirus sont une grande famille de virus enveloppés à ARN qui partagent plusieurs caractéristiques communes dont la structure et la composition de la particule virale ainsi que certaines propriétés au niveau du cycle réplcatif du virus (97). Notamment, la stratégie réplcative des virus de cette famille comporte une étape essentielle de rétrotranscription de l'ARN génomique virale en ADN bicaténaire qui subséquent sera intégré au génome de la cellule hôte. Actuellement, la famille des rétrovirus est divisée en trois sous-groupes selon des critères de pathogénie mais aussi selon des paramètres phylogénétiques : les oncovirus (HTLV), les spumavirus et les lentivirus.

Quoique le VIH partage de nombreuses similitudes avec les virus HTLV, le VIH possède davantage les caractéristiques morphologiques et génétiques propres au sous-groupe des lentivirus. Comme les autres rétrovirus, le VIH est un virus à ARN monocaténaire de polarité positive dont le diamètre de la particule virale est de 100 nm. Son génome de 9,8 kb est flanqué en 5' et en 3' par une même séquence de taille variable appelée long terminal repeat (LTR). Cette séquence qui permet

l'intégration du provirus au génome de la cellule hôte contient également les éléments nécessaires à l'expression des gènes viraux (432).

Généralement, on considère qu'il existe 2 classes de rétrovirus selon que leur organisation génétique soit simple ou complexe (97). Le génome des rétrovirus est composé d'au moins trois régions codantes principales : *gag* qui dirigent la synthèse des protéines internes du virion formant les structures de la matrice (MA), de la capside (CA) et de la nucléocapside (NC), *pol* qui codent pour les enzymes de la transcriptase inverse (RT), de la protéase (PR) et de l'intégrase (IN) nécessaires à la réplication virale et finalement, *env* générant la glycoprotéine de surface et transmembranaire du virion (SU et TM). Outre ces gènes essentiels à la multiplication virale, le VIH possède plusieurs autres gènes dits auxiliaires mais qui contribuent significativement à la pathogenèse du VIH. Il s'agit d'une part des gènes codant pour les protéines de régulation Tat (trans-activating protein) et Rev (regulator of expression of virion protein) et d'autre part, des gènes codant pour les protéines accessoires Vif (virion infectivity factor), Vpr/Vpx, Vpu (respectivement, viral protein R, X et U) et Nef (negative factor). L'organisation génétique complexe du VIH est illustrée à la figure 2.

2.2 Structure et composition de la particule virale

Comme tous les rétrovirus, le VIH est produit par bourgeonnement à la surface de la cellule infectée. Suite à l'assemblage de la polyprotéine structurale Gag à la membrane plasmique, il y a bourgeonnement des particules virales immatures du VIH. Grâce à l'action de la protéase virale, il y a clivage du précurseur p55^{Gag} afin de générer les protéines de la matrice, de la capside, de la nucléocapside et de la protéine p6. Par conséquent, dans le virion mature, la partie interne de la bicouche lipidique de la membrane virale est tapissée de la matrice, la nucléocapside protège le génome viral et, la capside se condense autour du complexe ribonucléique pour former la nucléocapside (Fig. 2) (195, 196, 221). Traversant la bicouche lipidique se trouve la portion transmembranaire de la glycoprotéine de l'enveloppe (TM ou gp41) qui est en contact avec la MA du côté interne du virion. Le domaine externe de la gp41 est associé avec le domaine de surface (SU ou gp120) de la glycoprotéine de l'enveloppe

du virus (389). Ainsi, des études de microscopie électronique nous montrent, à la surface des cellules infectées, la présence de virions sphériques possédant une nucléocapside dense en forme d'ogive constituée par la protéine de la capsid (221, 276).

Outre les deux copies d'ARN génomique, la nucléocapside contient également deux enzymes soient la transcriptase inverse, une ADN polymérase ARN dépendante, et l'intégrase. La protéase virale, qui se retrouve en dehors de la nucléocapside, permet non seulement le clivage des protéines structurales mais également le clivage du précurseur p160^{GagPol} afin d'obtenir les enzymes RT, IN et PR nécessaires à la réplication du virus. Plusieurs protéines accessoires du virus dont Nef, Vif et Vpr sont incorporées à la particule virale (61, 98, 543). La présence de toutes ces protéines virales à l'intérieur du virion suggèrent qu'elles jouent un rôle précoce lors de la réplication du VIH. Cependant, jusqu'à présent, seules les implications fonctionnelles de l'incorporation de Vpr ont pu être établies avec certitude (246, 409). Vpr est incorporée au virion grâce à son association avec la protéine p6 (278, 396).

3. Cycle de multiplication du virus

Le cycle de multiplication du VIH ressemble, à quelques éléments près, beaucoup à ce qui est décrit pour les autres rétrovirus. Le cycle de réplication du virus débute par l'attachement de la glycoprotéine de l'Env virale au récepteur cellulaire. Suite à cette reconnaissance, il y a pénétration de la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule. Pendant la décapsidation du génome viral s'amorce l'étape de rétrotranscription où l'ARN monocaténaire viral sera transcrit en ADN bicaténaire afin d'être transporté vers le noyau de la cellule où il y aura intégration de l'ADN proviral dans le génome cellulaire. Ainsi, le génome viral intégré pourra être transcrit par l'ARN polymérase II cellulaire afin de générer des ARNm qui seront différenciellement épissés. Les gènes viraux sont alors synthétisés et les protéines

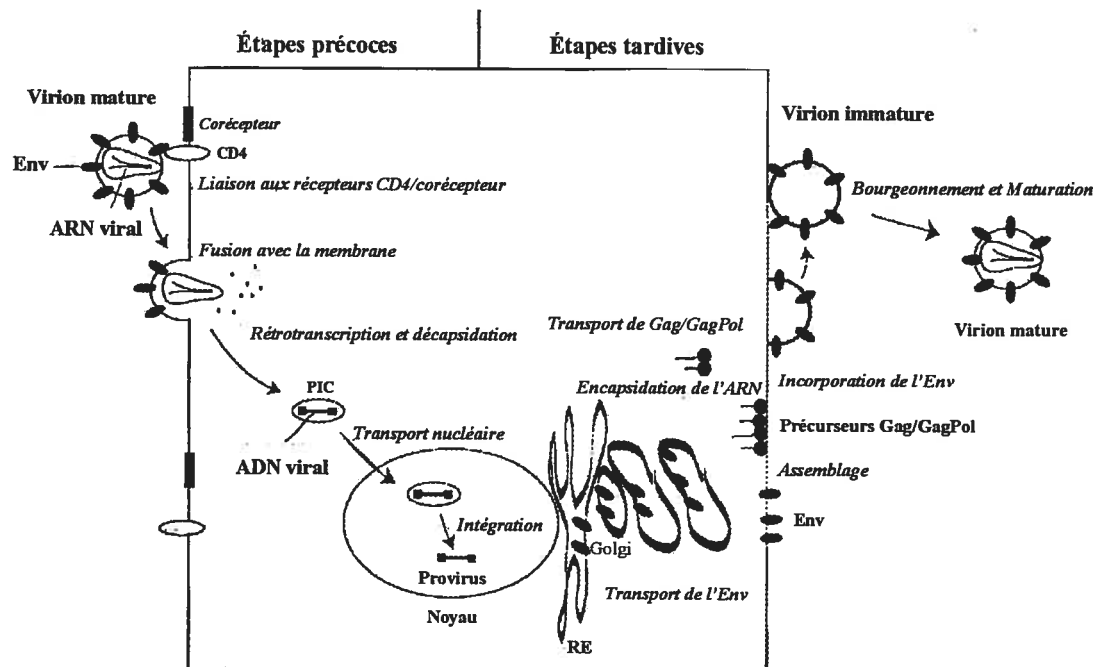


Figure 3. Cycle de réplication du VIH-1. Suite à l'entrée du virus dans la cellule, l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN double brin. L'ADN proviral est ainsi transporté au noyau de la cellule où il y aura intégration au génome cellulaire. Suite à la transcription du génome viral, les protéines seront traduites puis transportées à la membrane plasmique où il y aura assemblage, bourgeonnement et maturation de la particule virale nouvellement produite. Adapté de E.O. Freed. 2002. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. 26: 13-33.

structurales ciblées à la membrane plasmique vers le site d'assemblage du virus. La maturation de la particule virale bourgeonnante se produit suite à la relâche des virions. Dans la section qui suit, nous verrons de façon détaillée les diverses étapes du cycle de réplication du VIH qui sont schématisées à la figure 3.

4. Entrée du VIH-1 dans la cellule cible

4.1 Récepteurs cellulaires et tropisme

L'étape initiale de l'entrée du VIH dans la cellule repose essentiellement sur l'interaction entre la sous-unité gp120 de la glycoprotéine virale (Env) et son récepteur cellulaire CD4 quoique CD4 à lui seul ne soit pas suffisant pour permettre la fusion virale avec la cellule cible (112, 275). En effet, en 1996, les co-facteurs requis (co-récepteurs ou seconds récepteurs) ont été identifiés. Il s'agit des récepteurs de chimiokines : CXCR4 pour les virus T-tropiques et CCR5, principalement, pour les virus M-tropiques (8, 32, 85, 122, 145, 374).

4.1.1 Le récepteur CD4

4.1.1.1 Structure de la molécule CD4

La molécule CD4 est une glycoprotéine d'environ 55 KDa exprimée principalement à la surface des thymocytes, des lymphocytes T auxiliaires, des macrophages, des monocytes et des cellules de Langherans (365, 426, 511). Cette protéine transmembranaire est composée d'un domaine extracellulaire, d'une région transmembranaire et d'une courte queue intracytoplasmique (327). La portion extracellulaire de CD4 comprenant les 371 premiers acides aminés de la protéine mature, est repliée en 4 domaines (D1-D4) présentant une homologie structurale avec la superfamille des immunoglobulines qui sont séparés par une région charnière flexible située entre les domaines D2 et D3 de la molécule (Fig. 4A) (46, 47, 286, 535). La structure cristallographique de D1 à D4 de la molécule prédit un site d'homodimérisation situé en D4 (556) (Fig. 4B).

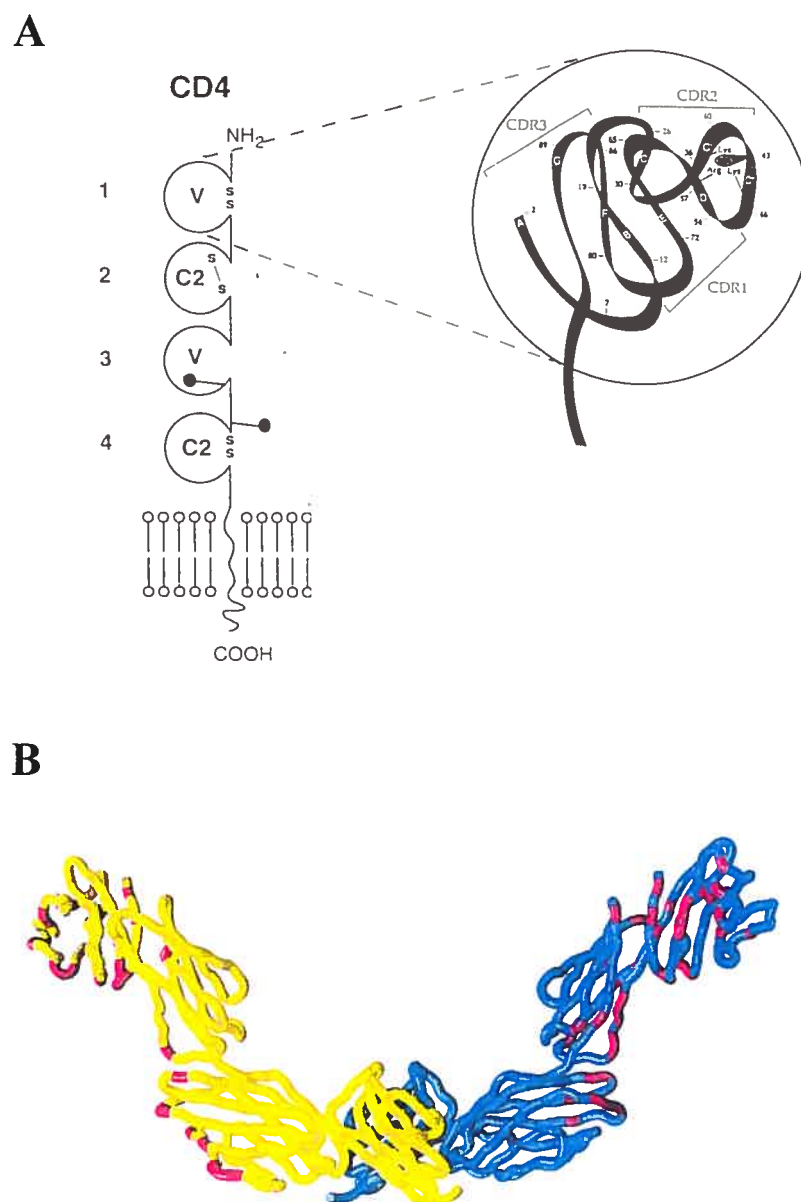


Figure 4. Structure du récepteur CD4. A. Représentation planaire de la structure de CD4 et agrandissement de la structure globulaire des domaines extracellulaires (D1-D4) . La région CDR2 est responsable de la liaison avec l'Env du VIH-1. CDR signifie « complementary determinant region ». Adapté de R. Brady et A. Barclay. 1996. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **205**: 1-18. B. Structure cristallographique des 4 domaines extracellulaires de CD4 avec l'interface de dimérisation située en D4. Une molécule de CD4 est jaune, la seconde étant bleue. Les atomes ayant moins de 4.0Å de distance avec les atomes des molécules adjacentes sont indiqués en magenta. Reproduit de H. Wu *et al.* 1997. *Nature.* **387**: 527-30.

Ces prédictions ont été confirmées biochimiquement démontrant ainsi l'existence de molécules dimériques de CD4 à la surface de cellules T primaires (323). Le domaine extracellulaire de CD4 est lié à la membrane par un domaine transmembranaire de 24 acides aminés hydrophobes. La région cytoplasmique C-terminale de la molécule est composée de 38 acides aminés et est impliquée dans la liaison de CD4 avec la tyrosine kinase p56^{lck} (327). Cette interaction nécessite toutefois la présence de 2 résidus cystéines conservés situés en position 420 et 422. (478, 526).

4.1.1.2 Fonctions du récepteur CD4

Outre ses fonctions lors de l'ontogénie des thymocytes, CD4 joue un rôle crucial lors de l'activation des lymphocytes T matures suite à la reconnaissance d'un antigène. Lors de la réponse antigénique, CD4 contribue non seulement à la stabilisation de l'interaction entre le lymphocyte T auxiliaire et la cellule présentatrice d'antigène (fonction de co-récepteur) (136, 192) mais, suite à l'interaction avec une région non-polymorphique du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II), contribue également à l'initiation d'une cascade de signalisation, (62, 191, 279) qui sera crucial pour la réponse antigénique des lymphocytes T CD4⁺ (192, 489). L'initiation de cette cascade de signalisation résultant en l'activation complète de la cellule T se produit principalement due à l'association de CD4 avec la tyrosine kinase p56^{lck} (262, 352). Les déterminants moléculaires impliqués dans l'interaction entre CD4 et le CMH-II sont surtout situés au niveau des domaines D1 et D2 de la molécule (165, 356, 357).

Récemment, il a été démontré que CD4 est enrichi à la membrane plasmique au niveau des radeaux lipidiques (353, 393). Les radeaux lipidiques sont des microdomaines membranaires composés principalement de sphingolipides et de cholestérol et qui sont insolubles dans les détergents non-ioniques. Ces microdomaines sont enrichis de protéines impliquées dans l'activation des cellules T dont les protéines liées au GPI, les récepteurs cellulaires et les tyrosines kinases ce qui suggère que les radeaux lipidiques pourraient servir de modules fonctionnels lors de la transduction de signal et des migrations membranaires (50, 486). Il est donc

possible que CD4 joue un rôle costimulateur en induisant une certaine réorganisation des radeaux lipidiques. La palmitoylation de résidus cystéines (acides aminés 396 et 399) situés dans un motif CVRV conservé et présent dans d'autres protéines associées aux radeaux lipidiques est essentielle à la localisation de CD4 au niveau des radeaux lipidiques. (170).

4.1.1.3 Effet du VIH-1 sur l'expression du récepteur CD4

Il est maintenant bien établi que lors de la réplication du VIH plusieurs protéines virales, dont Nef, Env et Vpu, entraînent une diminution de l'expression du récepteur CD4 de la surface de la cellule infectée (82, 405). Tout d'abord, tôt dans l'infection, la protéine accessoire Nef contribue à l'élimination rapide des molécules de CD4 déjà présentes à la surface cellulaire en facilitant l'endocytose de CD4 et sa dégradation subséquente au niveau des lysosomes (5, 82, 405).

Ensuite, lors des étapes tardives du cycle de réplication du virus, le précurseur gp160, du à son affinité élevée pour le récepteur, retient les molécules de CD4 néosynthétisées au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Les complexes gp160-CD4 ainsi formés non seulement préviennent l'expression de surface de CD4 mais bloquent la maturation et le transport de la gp160 (108, 266, 499). La rétention de CD4 au niveau du RE est probablement la conséquence indirecte du transport inefficace de la gp160 (544). Ce phénomène prend davantage d'importance tardivement au cours de l'infection au moment où la glycoprotéine gp160 est exprimée à de très hauts niveaux. D'autre part, la rétention de CD4 au niveau du RE est dépendante de la capacité de CD4 à lier la gp160 au niveau du RE et ne se produit pas dans les cellules infectées par un virus dont l'enveloppe possède une affinité réduite pour CD4 (289). Finalement, la protéine accessoire Vpu régule la demie-vie du récepteur CD4 au niveau du RE en induisant la dégradation spécifique de CD4 préalablement complexé à la gp160 (Fig. 5) (303, 546).

Ainsi, la capacité du VIH à moduler négativement l'expression de surface de CD4 représente un facteur important de la pathogenèse virale et confère probablement un avantage sélectif au virus lors de la réplication *in vivo*. À cet effet, de nombreuses publications ont permis de mettre en évidence que la diminution de

l'expression de CD4 médiée par Vpu et/ou Nef contribue à la propagation virale (41, 104, 291, 437). Toutes ces études démontrent qu'une forte expression de CD4 à la surface de la cellule infectée interfère avec la production de particules virales infectieuses; les mécanismes proposés étant toutefois différents.

Ross *et al.* ont démontré que la surexpression de CD4 dans les cellules fibroblastiques 293T exprimant le VIH-1 entraîne une diminution globale de la relâche de particules virales sans toutefois altérer le potentiel infectieux des virions relâchés (437). Cette étude démontre que cette inhibition de la relâche virale est dépendante de l'interaction spécifique intervenant entre CD4 et la glycoprotéine de l'enveloppe virale. Par ailleurs, ils ont également démontré que l'expression de Nef pouvait efficacement abolir cette inhibition de la relâche de particules virales en réduisant les niveaux de CD4 à la surface de la cellule infectée. Dans l'ensemble, les auteurs proposent que l'inhibition de la relâche des virions serait la conséquence directe de l'attachement des molécules de CD4 présentes à la surface cellulaire avec l'enveloppe des virions bourgeonnants entraînant ainsi une rétention des particules naissantes à la surface de la cellule.

Par ailleurs, Bour *et al.* ont également mis en évidence que l'expression de CD4 à la surface de la cellule inhibe la relâche de particules virales mais ce, indépendamment de l'expression de l'Env (41). De plus, étant donné que l'expression de CD4 en absence de Vpu n'entraîne pas d'effet sur la relâche des virions, les auteurs ont suggéré que CD4 agit en empêchant Vpu de médier sa fonction de relâche facilitée des virions. L'infectivité des virions n'a pas été analysée dans cette étude.

Finalement, Lama *et al.* ont démontré que l'expression de CD4 à la surface de la cellule infectée induit une réduction drastique du potentiel infectieux des virions relâchés (291). Cette perte d'infectivité observée en présence de CD4 serait le résultat de la séquestration de l'Env par CD4 loin des sites d'assemblage ce qui par conséquent entraînerait une diminution de l'incorporation de l'Env dans les particules virales bourgeonnantes. L'analyse biochimique des protéines virales a permis de mettre en évidence qu'en absence de Vpu et/ou Nef, CD4 peut être incorporé à la particule tout en bloquant efficacement l'incorporation de l'Env dans les virions. Plus récemment, Cortes *et al.* ont confirmé ces résultats dans les lignées Jurkat T et ont ainsi montré que CD4,

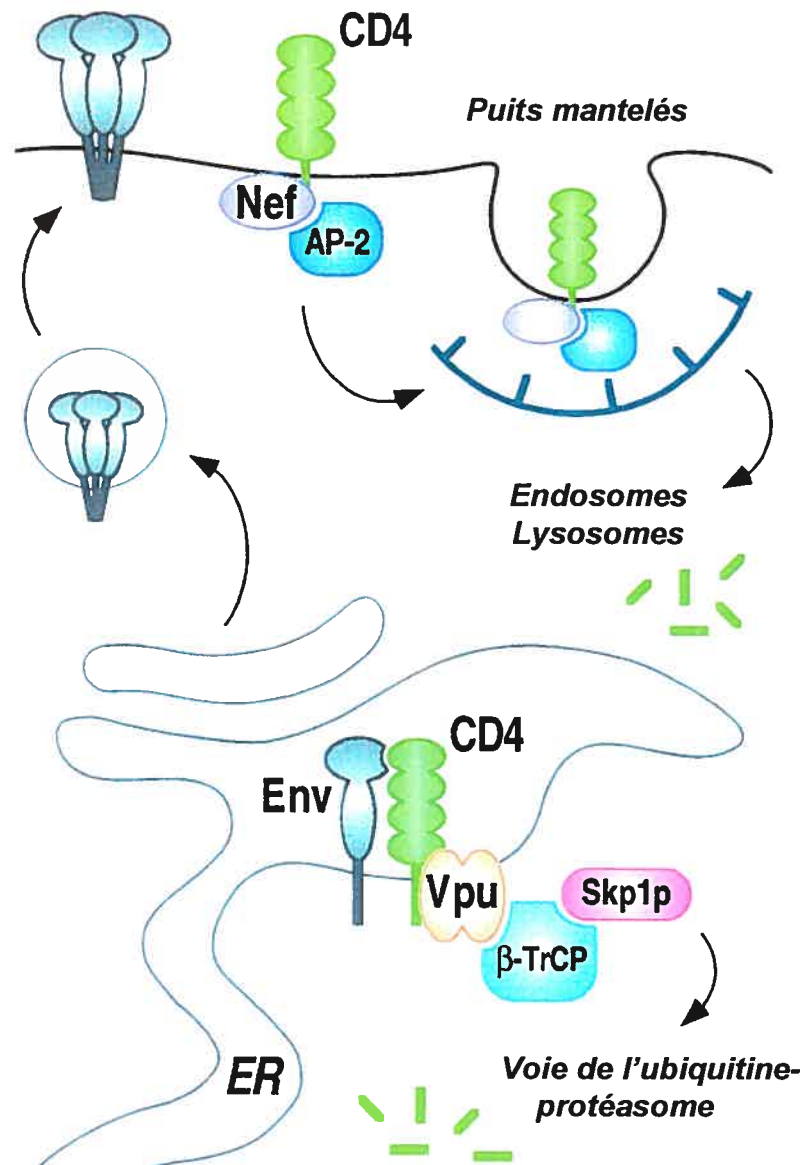


Figure 5. Diminution de l'expression de surface de la molécule CD4 lors de l'infection par le VIH-1. Lors de l'infection par le VIH-1, plusieurs protéines virales entraînent une diminution de l'expression de surface du récepteur CD4. Tôt dans l'infection, Nef contribue à l'élimination des molécules CD4 déjà présentes à la surface en facilitant l'endocytose de CD4 et sa dégradation subséquente au niveau des lysosomes. Lors des étapes tardives, Vpu régule la demie-vie de CD4 au niveau du réticulum endoplasmique en induisant la dégradation spécifique des molécules CD4 préalablement complexées au précurseur gp160. Reproduit de M. Emerman et M.H. Malim. 1998. *Science*. 280: 1881-1884.

lorsqu'exprimé à des niveaux physiologiques, interfère de manière enveloppe-dépendante avec le potentiel infectieux des particules virales relâchées (104).

Donc, outre le rôle prépondérant joué par CD4 au moment de l'entrée du VIH dans la cellule, ces études ont permis de mettre clairement en évidence que l'expression de surface de CD4 représente un facteur pouvant influencer l'assemblage et la relâche des particules virales entraînant ainsi des conséquences marquées sur la propagation virale.

4.1.2 Les récepteurs de chimiokines

4.1.2.1 Structure et fonctions

Les co-récepteurs CXCR4 et CCR5 ont la structure générale des récepteurs à sept passages transmembranaires et sont couplés pour leur activation aux protéines G trimériques. Ainsi, ils possèdent une région N-terminale extracellulaire et une région C-terminale cytoplasmique. La portion extracellulaire, de même que la portion intracytoplasmique de la protéine, sont composées de trois éléments en boucle dont la structure tridimensionnelle n'est pas exactement établie. La plupart des récepteurs de chimiokines partagent des homologies partielles avec d'autres récepteurs de chimiokines ce qui explique que leur ligand ne possède pas une spécificité très limitée et peuvent ainsi activer plus d'un récepteur. Par conséquent, les récepteurs de chimiokines, comme c'est le cas pour CCR5, peuvent généralement lier plusieurs chimiokines quoiqu'avec une affinité variable (538).

Outre la fonction de CXCR4 et CCR5 lors de l'infection par le VIH, en tant que récepteur de chimiokines, ces molécules ont un rôle important à jouer lors de la réponse immunitaire. Les chimiokines sont des petites protéines de 70-90 acides aminés qui sont essentiellement responsables de la migration et de l'activation de différents types de leucocytes lors de la réaction inflammatoire (537, 538). Il existe deux principales familles de chimiokines qui se regroupent selon la présence d'un acide aminé supplémentaire situé entre deux cystéines conservées dans la région N-terminale de la protéine : les deux cystéines des chimiokines CXC (α) étant séparées par un résidu et ce, contrairement aux chimiokines de type CC (β) (16, 379). Les

chimiokines de type CXC activent principalement les neutrophiles tandis que les chimiokines de type CC active généralement les monocytes, les lymphocytes, les basophiles et les éosinophiles (537, 538).

CXCR4 est une protéine de 352 acides aminés qui est transcrite à partir d'un cadre de lecture unique. La protéine a d'abord été clonée à partir d'une banque de cDNA de monocytes humains (318). CXCR4 possède deux sites potentiels de glycosylation, le premier étant situé dans la région N-terminale, et le second, au niveau de la seconde boucle extracellulaire de la protéine. La séquence en acides aminés de CXCR4 a permis d'établir une certaine homologie avec d'autres récepteurs de chimiokines α dont 34% d'identité partagée avec les récepteurs de l'IL-8, CXCR1 et CXCR2 (318). Le ligand de CXCR4 est SDF-1 (32, 374).

CCR5 est également une protéine de 352 acides aminés qui présente une homologie partielle avec d'autres récepteurs de β -chimiokines dont 76% d'homologie avec CCR2 et 58% avec CCR3 (452). Contrairement à CXCR4, CCR5 ne possède qu'un site potentiel de glycosylation qui est situé dans la troisième boucle de la protéine (452). Les ligands connus de CCR5 sont MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES et MCP-2 (102, 205).

CCR5 est exprimé principalement à la surface des macrophages (558,570), des cellules dendritiques (216, 570), des cellules microgliales (232) et des cellules T mémoires (33) mais, absent de la plupart des lignées cellulaires T (33, 354). Quant à CXCR4, il est exprimé non seulement à la surface des cellules T naïves et des lymphocytes T mémoires (33, 354) mais également à la surface des monocytes (318) et des macrophages différenciés (178). Ainsi, la répartition cellulaire de ces co-récepteurs explique en partie le tropisme cellulaire du VIH-1.

4.1.2.2 Rôle dans l'infection et la pathogenèse du VIH-1

Lors de l'entrée du VIH dans la cellule cible, les co-récepteurs jouent non seulement, comme nous le verrons dans la section suivante, un rôle crucial dans les étapes menant ultimement à la fusion de la particule virale à la membrane plasmique de la cellule mais constitue le principal déterminant du tropisme cellulaire. En effet,

on distingue deux principaux sous-types d'isolats du VIH : les virus M-tropiques qui se répliquent lentement et qui sont incapables d'induire la formation de syncytia (NSI) par opposition aux virus T-tropiques qui eux se répliquent à des niveaux très élevés tout en induisant la formation de syncytia (SI). En cours d'infection, le changement de tropisme du VIH représente un élément clé de la pathogenèse virale et du développement de la maladie. En effet, les souches M-tropiques sont sélectionnées lors de la transmission et représentent la forme dominante observée en primo-infection tandis que en phase asymptomatique, chez la majorité des individus infectés, l'émergence de variants T-tropiques coïncide avec le développement du SIDA (213, 281, 467, 512). Quoique les pressions sélectives conduisant ou prévenant ce changement de tropisme et de pathogénécité demeurent encore mal définies, la découverte des co-récepteurs du VIH a permis d'expliquer partiellement l'association des phénotypes NSI/M-tropique versus SI/T-tropique (122, 137).

En effet, de nombreuses études ont permis de démontrer que les virus de souche M-tropique utilise CCR5 comme co-récepteur tandis que les virus de souche T-tropique utilisent CXCR4 (8, 85, 133). Depuis la découverte de la nature des co-récepteurs utilisés par le VIH, la liste des protéines pouvant remplir ce rôle n'a cessé de s'accroître pour comprendre actuellement plus d'une douzaine de récepteurs dont CCR3 (85, 133), APJ (84), CCR2b (133), CCR8 (257), CX₃CR1 (441), CCR9 (84), ChemR23 (451), STRL-33 (123), GPR15 (123) ainsi que le protéine US28 du cytomégalo virus (407). Cependant, la vaste majorité des isolats du VIH-1 caractérisées jusqu'à présent utilisent principalement l'un ou l'autre des récepteurs CXCR4 ou CCR5; ces récepteurs étant les seuls à être utilisés à une haute efficacité par les différentes souches du VIH (484, 572).

L'importance de l'utilisation des récepteurs de chimiokines lors de l'infection par le VIH-1 a été renforcée par la découverte d'individus homozygotes pour une délétion de 32 nucléotides au niveau du gène de CCR5. Cette mutation entraîne la production d'une protéine tronquée incapable d'être exprimée à la surface de la cellule et par conséquent, confère une résistance à l'infection par le VIH-1 sans toutefois avoir de phénotypes délétères lors de la réaction inflammatoire chez les individus atteints (117, 249, 315, 454).

4.2 Mécanisme moléculaire de l'entrée

4.2.1 Reconnaissance du récepteur

L'entrée du VIH dans la cellule cible est un processus multiphasique qui est initié par une interaction de haute affinité (< 10 nM) se produisant entre CD4 et la glycoprotéine de l'enveloppe gp120 (295, 360, 456). Le site de liaison de la gp120 à CD4 a été identifié et correspond aux résidus regroupés au niveau de la région CDR2 (second complementary determinant region) située dans le premier domaine extracellulaire de CD4 (D1); le domaine D1 étant également le site de liaison du CMH-II (13, 165, 286, 443).

Actuellement, les mécanismes moléculaires par lesquels les co-récepteurs CXCR4 et CCR5 facilitent l'internalisation du VIH-1 dans la cellule sont mieux compris. Suite à la reconnaissance initiale de CD4, il y a formation d'un complexe hétérotrimérique entre l'enveloppe virale, CD4 et le récepteur de chimiokine (294, 525, 557) menant aux étapes subséquentes de l'entrée qui résultent ultimement en la fusion des membranes virales et cellulaires (497) (Fig. 6). Des études de mutagenèse ont permis de déterminer que les régions de CCR5 impliquées dans la liaison aux chimiokines sont distinctes des régions nécessaires pour la reconnaissance de l'Env et ce, pour de nombreuses souches du VIH. En effet, la reconnaissance des chimiokines se fait via la seconde boucle extracellulaire de CCR5 tandis que la région N-terminale et la première boucle extracellulaire de la protéine semblent responsables de la fonction de co-récepteurs (442, 453). Quant à CXCR4, ce serait la portion N-terminale ainsi que quelques résidus localisés au niveau de la seconde et troisième boucle extracellulaire de la protéine qui permettraient l'attachement à l'Env (48, 310). Par ailleurs, plusieurs mutants de CXCR4 incapables d'induire une signalisation intracellulaire et/ou de lier SDF-1 peuvent toujours soutenir une infection virale suggérant par conséquent que la fonction de co-récepteur de CXCR4 est indépendante de la fonction de signalisation de la molécule (132).

Outre CD4 et les co-récepteurs, de nombreuses autres molécules ayant la capacité de lier la gp120 ont été identifiées incluant les « mannose-binding protein » à la surface des macrophages et DC-SIGN présent à la surface des cellules

dendritiques (193, 370). Ces récepteurs étant incapables de promouvoir les étapes de fusion lors de l'entrée, il a été suggéré que leur rôle serait de faciliter l'attachement du virus aux cellules en lui permettant d'interagir avec des concentrations suboptimales de CD4 et/ou de co-récepteurs. Alternativement, ces récepteurs pourraient permettre le transport de particules virales emprisonnées à la surface des cellules dendritiques et des macrophages vers les ganglions lymphatiques où la transmission aux cellules cibles seraient possibles (194).

4.2.2 Rôle des radeaux lipidiques dans l'entrée

Récemment, de nombreuses études ont permis de mettre en lumière l'importance des radeaux lipidiques lors de l'entrée du VIH-1 dans la cellule. Tel que mentionné plus tôt, il a été démontré que CD4 est enrichi à la membrane plasmique au niveau des radeaux lipidiques (353, 393). Non seulement le récepteur primaire du VIH se localise au niveau de ces structures membranaires spécialisées mais les co-récepteurs CXCR4 et CCR5 le sont également (335, 372, 373). Comme il existe une corrélation entre la densité à la surface de la cellule des récepteurs du virus et l'efficacité de l'infection, il est tentant de croire que la localisation de CD4 et des co-récepteurs au niveau de régions délimitées de la membrane plasmique pourrait faciliter l'infection (130). À cet effet, il est bien établi que non seulement l'intégrité des radeaux lipidiques doit être préservée au moment de l'entrée mais également que le récepteur CD4 doit y être localisé puisque des mutants de CD4 ayant perdu la capacité d'être ciblés aux radeaux lipidiques sont incapables de soutenir l'infection par le VIH (120).

Cependant, quoique CD4 et les co-récepteurs se retrouvent associés aux radeaux lipidiques, il a été démontré qu'il ne semble pas y avoir de co-localisation entre ces molécules suggérant l'existence de divers types de radeaux lipidiques dont la composition protéique peut varier selon la fonctionnalité du micro-domaine (334, 434, 487). Ainsi, selon Manes *et al.*, au moment de l'entrée, la formation du complexe trimérique entre l'Env, CD4 et le co-récepteur serait dépendante de mouvements latéraux membranaires permettant le recrutement du co-récepteur au site initial de la reconnaissance entre le virus et la cellule cible (334). Ces résultats ont

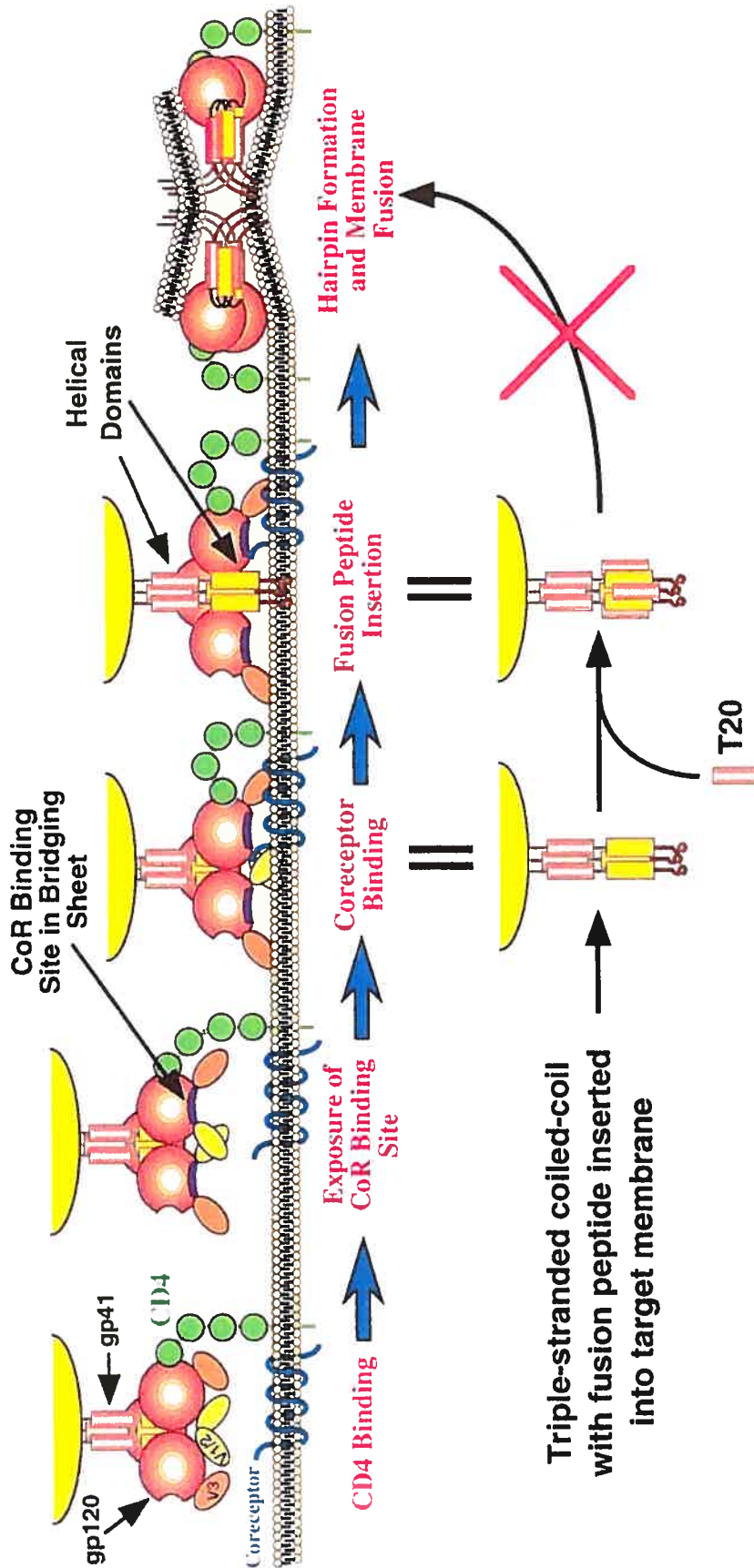


Figure 6. Mécanisme moléculaire de l'entrée du VIH-1. L'entrée du virus dans la cellule est un processus multiphasique initié par la liaison de l'Env avec le récepteur CD4. Suite à la reconnaissance de CD4, il y a formation d'un complexe hétérotrimérique entre l'Env, CD4 et le corécepteur entraînant des changements de conformation de l'Env. Ces changements de conformations de l'Env résultent ultimement en l'exposition du peptide fusogénique de la gp41 entraînant ainsi la fusion des membranes virales et cellulaires. Le T20 est une molécule thérapeutique empêchant l'étape de fusion. Reproduit de R. W. Doms et D. Trono, 2000. *Genes and development*. 14: 2677-2688.

par ailleurs été confirmés par Popik *et al.* à la seule différence que, dans les conditions utilisées, les auteurs ont été en mesure d'observer une co-localisation partielle de CD4 et des co-récepteurs ce qui n'a pu être observé par Manes *et al.*

Ainsi, les auteurs ont pu démontrer que lorsque l'intégrité des radeaux lipidiques est préservée, l'attachement du VIH à la surface de la cellule entraîne une réorganisation spatiale des radeaux lipidiques menant à la polarisation et à l'agrégation des récepteurs viraux au site d'entrée (412).

4.2.3 Fusion

Suite à l'attachement de la particule virale aux récepteurs CD4, plusieurs changements de conformations au niveau de la gp120 se produiront ce qui entraînera l'exposition d'une loupe de la région V3 de l'enveloppe et permettra la reconnaissance des corécepteurs CCR5 ou CXCR4 (Fig. 6) (359, 361). La région V3 (troisième boucle variable) de la gp120 constitue le site de liaison aux récepteurs de chimiokines et représente le principale déterminant du tropisme viral (251). À cet effet, il a été démontré que des molécules de CD4 solubles pouvaient entraîner la fusion entre des cellules exprimant Env et des cellules cibles exprimant les corécepteurs mais non CD4 (448) accentuant davantage le rôle de CD4 dans l'induction de l'exposition de la loupe V3 de l'Env (288).

Subséquemment, la liaison aux corécepteurs entraîne l'exposition du peptide fusogénique de la gp41 et permet la fusion des membranes virales et cellulaires (180, 229). Sur le plan mécanistique, il a été démontré que la liaison d'une seule sous-unité de la gp120 à CD4 et au corécepteur est suffisante afin d'initier l'exposition du peptide fusogénique d'une sous-unité de la gp41 présente sur une molécule différente de l'oligomère de l'Env, suggérant ainsi un niveau de complexité additionnel au niveau de l'association gp120-gp41 (447). Actuellement, des nombreux efforts sont consacrés au développement d'une nouvelle génération de molécules anti-virales ciblant précisément cette étape cruciale du cycle d'infection du VIH-1. Des molécules, tel le T20, dont le potentiel thérapeutique est prometteur, font d'ailleurs l'objet d'étude clinique de phase III (17).

4.2.4 Décapsidation

Suite à la fusion des membranes virales et cellulaires, le virus pénètre dans la cellule. Quoique certaines études semblent indiquer un rôle de la voie endocytyque au moment de l'entrée, de manière générale, le virus entre dans le cytoplasme des cellules T CD4⁺ sans l'intermédiaire des endosomes (152, 339, 497). La fusion est alors suivie de la décapsidation du génome viral dans le cytoplasme de la cellule. La décapsidation peut se définir comme étant l'étape au cours de laquelle l'ARN viral est libéré des nucléoprotéines et des autres protéines virales pour laisser place au complexe de rétrotranscription et de pré-intégration. Pendant cette étape, il y a perte de la protéine de la capsidie tandis que la matrice, la nucléocapside, les enzymes virales de la transcriptase inverse et de l'intégrase ainsi que la protéine virale Vpr demeurent associées au génome viral.

Quoique la décapsidation représente une étape cruciale lors de la réplication du VIH, il existe très peu de données quant au mécanisme précis menant à la décapsidation du génome viral. Toutefois, des données biochimiques ainsi que des études de microscopie électronique ont permis de mettre en évidence que, suite à l'entrée, la capsidie virale se désassemble rapidement pour permettre à la transcriptase inverse de fonctionner efficacement (155, 167, 220, 265).

5. Étapes de pré-intégration

Immédiatement après l'internalisation du virus dans la cellule, le génome viral est rétrotranscrit en ADN double-brin. La rétrotranscription se produit au niveau du cytoplasme de la cellule en association avec les protéines virales nécessaires au transport du complexe de pré-intégration vers le nucléoplasme. Ce complexe de pré-intégration, formé dans le cytoplasme, doit franchir la membrane nucléaire de la cellule pour pouvoir intégrer l'ADN proviral dans le génome cellulaire. Les sections qui suivent détaillent les étapes menant à l'intégration de l'ADNc viral au génome de la cellule infectée.

5.1 Rétrotranscription

Au cours des étapes précoces de l'infection, les rétrovirus convertissent leur génome d'ARN monocaténaire en ADN bicaténaire. Cette réaction est catalysée par la RT (18, 510). La RT du VIH-1 est un hétérodimère constitué de deux sous-unités; la p66 et la p51. Ces deux sous-unités sont obtenues suite au clivage du précurseur Pr160^{GagPol} par la protéase du virus et possèdent la même extrémité amino-terminale. Les deux sous-unités participent à l'activité polymérase de l'enzyme mais seule la p66 possède l'activité RNase H qui permet la dégradation de l'ARN dans l'hybride ARN/ADN (128, 519). Contrairement aux autres polymérases de l'ADN, la RT ne possède pas d'activité de correction ce qui par conséquent engendre une fréquence de mutations très élevée (3×10^5 par cycle de réplication) (338).

Tout comme les autres rétrovirus, au moment de l'assemblage, le VIH encapside deux copies de l'ARN du génome viral dans le virion. Comme nous le verrons dans cette section, étant donné que le processus de la rétrotranscription implique de nombreux transferts d'une matrice à l'autre, l'affinité de l'interaction entre la RT et la matrice est relativement faible (509). De ce fait, il a été démontré que, pendant la rétrotranscription, la RT peut facilement sauter d'une matrice à l'autre. Donc, si les deux molécules d'ARN incorporées à la particule virale ne sont pas génétiquement identiques, ce changement de matrice génère un nouveau génome viral recombinant qui est dérivé de la séquence des deux ARNs parentaux (394). Ainsi, la faible fiabilité de la RT combinée à la fréquence élevée de recombinaisons génétiques obtenues lors de la rétrotranscription donne lieu à l'apparition de populations virales dont les séquences sont largement hétérogènes. Ces populations sont nommées quasi-espèces. Par conséquent, lors de la réplication, les diverses pressions sélectives de l'hôte donnent lieu à l'émergence de mutations concédant au virus un avantage réplcatif qui permet au VIH d'échapper rapidement à la réponse immunitaire de l'hôte et de développer des variants résistants aux traitements anti-viraux.

La transcription inverse est un processus multiphasique utilisant de nombreux éléments en *cis* situés au niveau du génome viral. Les diverses étapes de la rétrotranscription sont illustrées à la figure 7. L'enzyme commence la synthèse de

l'ADN en 5' de l'ARN viral en utilisant comme amorce l'extrémité 3'-OH d'un ARN de transfert lysine (ARNt^{Lys}) se liant spécifiquement à la séquence PBS (priming binding site) de l'ARN viral (19). Afin de pouvoir initier la transcription inverse, cet ARNt^{Lys} est sélectivement incorporé dans la particule virale grâce à une interaction avec le précurseur Pr160^{GagPol} (328, 329). La synthèse complète de l'hybride ADN/ARN nécessite un transfert de brin de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' de l'ARN. Au moment d'effectuer ce transfert, l'activité RNase H est essentielle puisqu'elle permet de libérer l'extrémité nouvellement synthétisée du premier brin d'ADN. Une fois monocaténaire, l'ADN peut s'hybrider avec la région 3' de l'ARN viral au niveau de courtes séquences homologues redondantes situées dans la région R (506). Ce premier transfert de brin est critique pour la synthèse complète du premier brin d'ADN complémentaire.

Certaines régions de l'ARN sont moins sensibles à l'activité enzymatique de la RNase H ce qui a pour effet d'induire la formation d'amorces obtenues par digestion partielle de l'hybride ARN/ADN. C'est le cas de la séquence PPT (polypurine tract) qui servira d'amorce lors de la synthèse du second brin d'ADN initiée en 5' du premier brin d'ADN et ce, avant la dégradation complète de l'ARN (80, 162). La synthèse du second brin nécessite un deuxième transfert de brin de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' du premier brin. Le deuxième transfert de brin est catalysé par l'activité de la RNase H qui dégrade l'ARNt^{Lys} lié à la séquence PBS de l'ARN viral. Ainsi, la séquence PBS du premier brin, synthétisée à partir du génome viral, s'hybride à la séquence PBS du second brin, synthétisé à partir de ARNt^{Lys} ce qui permet à la RT de terminer l'élongation complète des deux brins d'ADN complémentaires (23, 114). Ainsi, lors de la rétrotranscription il y a duplication des séquences U3 et U5 situées aux extrémités de l'ARN viral (5' R-U3---ARN viral---U5-R 3') ce qui donne lieu à la formation du LTR caractéristique (5'-U3-R-U5-3') situé à chaque extrémité de l'ADN rétroviral. Le produit final de la rétrotranscription consiste donc en un hétéroduplexe d'ADN linéaire aux extrémités franches dont l'arrangement définitif devient « 5'-U3-R-U5-----ADN-----U3-R-U5 3' » (51, 438).

Par ailleurs, le VIH possède un signal de terminaison central situé au centre du génome viral. Vu la localisation de ce signal à proximité du PPT central, lors de la

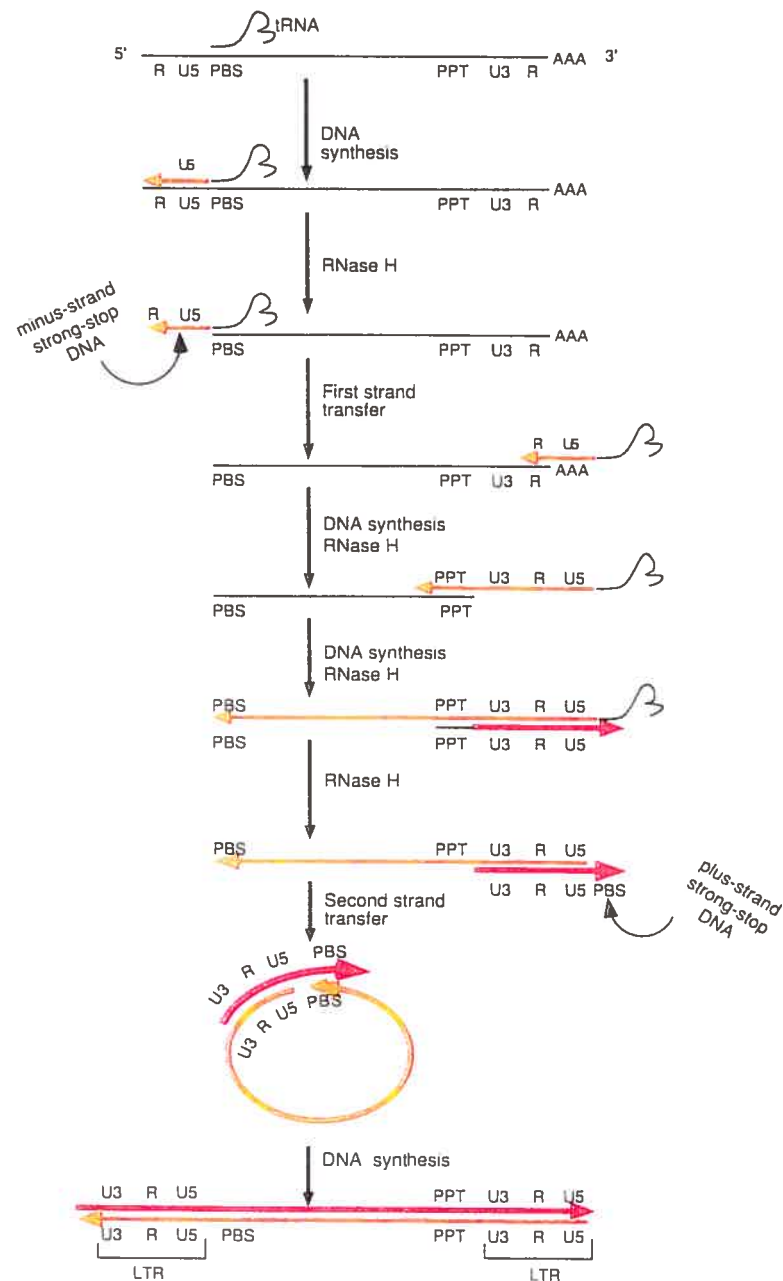


Figure 7. Mécanisme moléculaire de la transcription inverse du génome rétroviral. Suite à la liaison de l'ARNt^{Lys}, la transcriptase inverse amorce la synthèse du premier d'ADN. L'activité RNaseH de la transcriptase inverse dégrade les hybrides ARN/ADN. Afin de générer une molécule d'ADN bicaténaire, la transcriptase inverse doit procéder à de nombreux transferts de brins. Le produit final de la rétrotranscription consiste en un hétéroduplexe d'ADN linéaire aux extrémités franches dont l'arrangement définitif devient « 5'-U3-R-U5---ADN---U3-R-U5-3' ». Reproduit de J.M. Coffin *et al.* 1998. *Retrovirus*. p. 123.

synthèse du deuxième brin, il y a formation d'un intermédiaire d'ADN triple-brin appelé « DNA flap » (79). Récemment, il a été suggéré que la présence du DNA flap pourrait être essentielle lors du transport du complexe de pré-intégration au noyau (571).

5.2 Transport nucléaire du complexe de pré-intégration

Suite à la rétrotranscription, le complexe de pré-intégration doit traverser les pores nucléaires pour accéder au nucléoplasme afin de s'intégrer au génome cellulaire. Le génome des oncorétrovirus pénètre dans le noyau de la cellule au moment de la rupture de la membrane nucléaire lors de la division cellulaire (308, 431). Contrairement aux autres rétrovirus, le VIH peut effectuer le transport actif de son matériel génétique contenu dans le complexe de pré-intégration (PIC) à travers l'enveloppe nucléaire (56). C'est cette particularité qui permet au VIH de se répliquer dans les cellules quiescentes tels les macrophages (307, 540). L'import nucléaire est gouvernée par les importines α et β ; membres de la famille des karyophérines (541). Les importines α sont responsables de la reconnaissance des signaux de localisation nucléaire (NLS) tandis que les importines β médient la translocation nucléaire du complexe protéique (3, 208, 417). Ainsi, dans les cellules quiescentes, il semblerait que la présence de ces signaux karyophiles au sein des diverses composantes du complexe de pré-intégration du VIH faciliterait son transport actif au noyau (55, 125, 169, 183, 184, 233). En effet, dans les cellules quiescentes, la protéine p17 (MA), Vpr, l'intégrase ainsi qu'un déterminant structural, le DNA flap, participent directement au transport actif du complexe de pré-intégration du cytoplasme vers le noyau de la cellule infectée (57, 233, 571). Toutefois, le mécanisme précis par lequel chacune de ces protéines ainsi que le DNA flap contribue au transport du complexe de pré-intégration reste à être élucidé puisqu'à présent la plupart des données existant quant à la contribution relative de chacun de ces éléments demeurent contradictoires (54, 531).

5.3 Intégration du génome viral

Suite au transport nucléaire du complexe de pré-intégration, l'intégrase virale catalyse l'insertion de l'ADN double-brin du génome viral dans le chromosome de la cellule hôte. L'ADN intégré, aussi appelé ADN proviral, se comporte alors essentiellement comme tous les autres gènes cellulaires. L'intégrase est une protéine de 32 kDa qui est produite à partir de la région située en 3' de *pol* immédiatement après les séquences codant pour la RT (53). La protéine se divise essentiellement en trois domaines : i) un domaine HHCC, situé en N-terminal, caractérisé par la présence d'un doublet d'histidine et de cystéine conservés chez toutes les intégrases virales (259), ii) le site actif de la protéine (146) et finalement iii) un domaine de liaison à l'ADN situé en C-terminal de la protéine (147, 553). Le site actif de l'intégrase est caractérisé par la présence du motif DD35E composé de trois acides aminés essentiels pour la catalyse, soit Asp⁶⁴ et Asp¹¹⁶ qui sont liés à un ion magnésium tandis que le troisième acide aminé essentiel Glu¹⁵², quant à lui, n'établit pas de liaison avec le métal (146, 269, 285). Quoique lors de l'intégration, le VIH ne semble pas favoriser l'utilisation d'un site spécifique au niveau du génome cellulaire, il semblerait cependant que le choix du site d'intégration ne se fasse pas de manière complètement aléatoire et que l'intégration se fasse préférentiellement au niveau de site transcriptionnellement actif (459).

Le processus de l'intégration débute par l'élimination de deux nucléotides à chacune des extrémités 3' de l'ADN viral. Le clivage se produit du côté 3' du dinucléotide CA qui semble être conservé chez non seulement chez tous les rétrovirus mais également chez les rétrotransposons et les transposons d'origine tant eucaryote que procaryote. Cette réaction permet d'exposer un groupement 3'-hydroxyl qui servira lors de l'appariement avec l'ADN cellulaire cible (59, 438). Le modèle actuel suggère que l'intégrase clive l'ADN viral ainsi que cellulaire et catalyse leur liaison simultanément (142). Donc, parallèlement, l'intégrase clive le génome cellulaire à un seul endroit produisant des extrémités cohésives possédant 4 bases non-appariées qui seront liées à l'ADN viral (202). L'intégration est complétée lorsque la machinerie de réparation de l'ADN cellulaire remplace les nucléotides non-appariés et remplit les jonctions créées par le clivage initial de l'ADN viral et

cellulaire (49, 567). Conséquemment, le processus d'intégration résulte en la perte de deux paires de bases du génome viral et en la duplication de cinq paires de bases du génome cellulaire et ce, à chaque extrémité du site d'intégration (239).

6. Étapes de post-intégration : régulation de l'expression des gènes

Suite à l'intégration du génome viral au chromosome de l'hôte, le provirus intégré sert de matrice à la synthèse des ARNm viraux qui seront traduits afin de générer les protéines structurales, régulatrices et accessoires nécessaires à la réplication du VIH. Dans la section qui suit, nous traiterons du contrôle de l'expression des gènes du VIH en insistant particulièrement sur le rôle joué par les protéines de régulation Tat et Rev lors de la transcription et de l'export des ARNm vers le cytoplasme.

6.1 Rôle de Tat dans la transcription

Le LTR 5' du VIH contient le site d'initiation de la transcription et possède de nombreux éléments agissant en *cis* qui sont requis pour la synthèse des ARNm viraux. L'initiation de la transcription est un processus impliquant l'ajout successif de plusieurs facteurs de transcription ce qui rend le processus hautement régulé. Le LTR est composée de 3 régions : U3 (pour extrémité 3' unique), R (pour répétée) et U5 (pour extrémité 5' unique); la transcription étant initiée à la jonction U3/R. La région U3 contient de nombreux éléments qui permettent non seulement le recrutement de l'ARN polymérase II cellulaire afin d'initier la transcription des ARNm viraux mais renferme également une multitude de sites d'attachement pour des facteurs de transcription cellulaires (432). Tout d'abord, à proximité du site d'initiation de la transcription (environ à 25 nucléotides), on retrouve un site TATA qui permet l'attachement du facteur de transcription TFIID. En amont du site TATA, on retrouve trois sites de liaison au facteur Sp1 ainsi que deux sites de liaison de NF- κ B (188, 234). Malgré que certains auteurs aient rapporté que la présence des sites de liaisons de NF- κ B et de Sp1 soit essentielle à l'activation de la transcription à partir du LTR du VIH, l'importance de ces sites est très variable selon les types cellulaires utilisés (290, 436). Toutefois, leur élimination complète abolit totalement la

réplication du VIH. De plus, en amont des sites NF- κ B se trouve un domaine appelé « modulatory region » caractérisé par la présence de sites additionnels de liaison à des facteurs de transcription dont LEF, Ets et USF (432).

L'activité transcriptionnelle basale du LTR du VIH est très faible. Ainsi, la présence de l'activateur de la transcription Tat est essentielle à l'expression des protéines virales puisque Tat permet d'augmenter de manière considérable la synthèse des ARNm viraux (115, 164). Tat est une protéine de 86 acides aminés dont l'expression s'avère indispensable à la réplication du VIH (491). Afin de remplir sa fonction, la protéine doit se lier à une tige boucle d'ARN présente au niveau de la région TAR (transactivation response region) présente en 5' de tous les ARNm viraux (25, 473). Cette interaction permet le recrutement et l'assemblage d'une série de complexes protéiques dont la p300 histone-acétyl-transférase (HAT) qui modifie la conformation de la chromatine au site d'intégration du génome viral et P-TEFb qui induit la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II favorisant ainsi l'élongation des transcrits d'ARNm viraux (111, 237, 261, 343).

6.2 Épissage des ARNm

Outre le fait d'utiliser la machinerie transcriptionnelle de la cellule, le VIH tire également avantage de la machinerie d'épissage de la cellule infectée afin d'exprimer ses protéines. Tous les ARNm pleine longueur des rétrovirus possèdent des signaux permettant l'excision de séquences introniques. Chez le VIH, on retrouve quatre sites donneurs et six sites accepteurs d'épissage qui permettent de générer plus d'une vingtaine de transcrits différents codant pour les diverses protéines du virus (416, 470). Il existe trois principales classes d'ARNm viraux. Tout d'abord, les messagers non-épissés qui représentent non seulement l'ARN génomique qui sera encapsidé lors du bourgeonnement mais également les messagers codant pour les précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol}. Ensuite, les messagers mono-épissés qui codent pour Vpu, Env, Vpr et Vif et finalement, les petits messagers multi-épissés qui codent pour les protéines dont l'expression est précoce lors du cycle de réplication soient les protéines Tat, Rev et Nef. Ainsi, les multiples signaux d'épissage présents dans le génome du VIH tout comme l'utilisation de l'épissage alternatif constituent

des mécanismes de régulation permettant de mieux contrôler les proportions relatives des protéines exprimées affectant ainsi indirectement la propagation du VIH (179, 416).

6.3 Rôle de Rev dans l'export des ARNm vers le cytoplasme

Tout comme la plupart des ARNm cellulaires, seuls les ARNm viraux complètement épissés sont efficacement transportés au cytoplasme pour y être traduits. Conséquemment, tôt dans l'infection, seuls les gènes codant pour les protéines Tat, Rev et Nef seront traduits. C'est l'action combinée de la protéine Rev et de la séquence RRE présente au niveau de l'ARN qui permettra aux ARNm mono-épissés et non-épissés d'être transportés vers le cytoplasme. Rev est une phosphoprotéine de 19 kDa encodée par deux exons tous deux essentiels à la fonction de la protéine (408). En effet, Rev possède deux domaines fonctionnels; le premier étant requis pour la localisation nucléaire et l'attachement de la protéine à la séquence RRE (Rev responsive element), le second, permettant l'export nucléaire de la protéine. La région RRE est une séquence d'ARN (250 nucléotides) dont le repliement permet l'obtention d'une structure secondaire assez complexe composée de plusieurs tiges boucles. Cette séquence, située au niveau du gène de l'*env*, est présente chez tous les ARNm complets (9,8 kb) et mono-épissés (4 kb) (332, 435). Le RRE, lorsque reconnu par Rev, permet le transport nucléo-cytoplasmique des ARNm mono-épissés ou non-épissés. Donc, tôt lors de l'infection, Rev s'accumule au niveau du noyau jusqu'à ce que la stochiométrie de la molécule permette son oligomérisation au niveau du RRE. L'hypothèse actuelle veut que la formation de ce complexe masque le signal de localisation nucléaire de Rev tout en exposant son signal d'exportation nucléaire (NES) ce qui permet au complexe d'interagir avec la machinerie d'export nucléaire (235). Récemment, la protéine Crm1, a été identifiée comme étant un des partenaires cellulaires impliqués dans l'export des ARNm viraux. Crm1 est une protéine localisée au nucléoplasme qui interagit avec les protéines des pores nucléaires (177). Par ailleurs, il a été établi qu'un mutant trans-dominant négatif de Rev, Rev M10 qui possède un NES défectif, était incapable d'interagir avec Crm1 (34). Ainsi, l'interaction de Rev avec Crm1 catalyse la

translocation des ARNm où le complexe Rev/RRE est exposé vers le cytoplasme ce qui permet aux ARNm codant entre autres pour les gènes structuraux d'être traduits. Suite à cette translocation, Rev peut retourner au noyau grâce à la présence de son signal de localisation nucléaire. Par ailleurs, au niveau des gènes *gag*, *pol* et *env*, se trouvent plusieurs séquences agissant en *cis* empêchant l'utilisation de ces ARNm en absence de Rev ajoutant par conséquent, un niveau supplémentaire de régulation de l'expression des ARNm. Ces éléments agissent probablement en se liant à des facteurs cellulaires nucléaires qui empêchent l'export des ARNm ayant ces séquences (331, 435).

7. Protéines structurales

Une fois les ARNm efficacement transportés au cytoplasme, la synthèse des protéines structurales s'amorce. Les polyprotéines qui sont utilisées afin d'initier l'assemblage sont codées par les gènes *gag*, *pol* et *env* qui sont communs à tous les rétrovirus. La section qui suit décrit plus en détails la synthèse, la structure et la maturation de ces protéines structurales.

7.1 Synthèse des précurseurs Gag et GagPol

Chez les rétrovirus, les protéines structurales et enzymatiques faisant partie de la particule virale sont initialement synthétisées sous forme de précurseurs polyprotéiques possédant une extrémité N-terminale commune. Le précurseur Gag est une polyprotéine de 55kDa dont le cadre de lecture est situé à l'extrémité 5' des ARNm. Suite à l'action de la protéase virale, le clivage de Pr55^{Gag} générera les composantes structurales majeures de la capside virale soient la matrice, la capside, la nucléocapside et la protéine p6. Quant au cadre de lecture de *pol*, codant pour les protéines enzymatiques, il est situé en 3' de Gag et sa traduction est le résultat d'un glissement ribosomale (527). En effet, environ une fois sur vingt, au moment de la traduction du précurseur Gag, il se produit un glissement ribosomal de 1 nucléotide vers l'arrière ce qui entraîne un changement de cadre de lecture et permet la synthèse du précurseur Pr160^{GagPol} (254, 551). Par conséquent, ce changement de cadre de lecture empêche la reconnaissance du codon stop de *gag* et permet à la traduction de

se poursuivre. Ainsi, outre les protéines enzymatiques situées en 3', la portion 5' de GagPol contient également les domaines de la MA, de la CA et de la NC ainsi que quelques polypeptides impliqués dans l'assemblage.

Chez les virus utilisant le glissement ribosomal, l'efficacité de ce mécanisme de traduction régulée détermine le rapport relatif de protéines structurales et d'enzymes qui seront disponibles lors de l'assemblage. Chez le VIH, le ratio de Gag/GagPol synthétisé varie généralement entre 20:1 et 60:1. Chez de nombreux virus, il a été démontré qu'il est primordial de maintenir des rapports précis entre la synthèse des protéines structurales et enzymatiques (154). En effet, l'altération, si minime soit-elle, du processus du glissement ribosomal inhibe drastiquement la propagation virale (131).

Le clivage des précurseurs Gag et GagPol représente une étape essentielle à la maturation des virus bourgeonnants afin de générer des particules virales infectieuses. Conséquemment, les différents domaines présents au sein des protéines structurales de la capsid virale possèdent des rôles distincts selon qu'ils soient utilisés dans le virion sous leur forme immature ou mature. Dans la section qui suit, le rôle des différentes protéines structurales lors de l'assemblage sera discuté.

7.2 Structure et maturation de Env

La glycoprotéine gp160 du VIH est produite à partir d'un ARNm bicistronique codant également pour Vpu (471). La glycoprotéine de l'enveloppe est d'abord synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique rugueux en polyprotéine précurseur (gp160) d'environ 845 à 870 acides aminés (9, 528). Lors de son transport à la membrane plasmique, ce précurseur de l'Env inactif est alors clivé par une protéase cellulaire appartenant à la famille des convertases pour générer la glycoprotéine de surface (SU) gp120 qui est associée de façon non-covalente à la glycoprotéine transmembranaire (TM) gp41 (366, 528, 544). La gp120 contient les déterminants responsables de la liaison aux récepteurs cellulaires tandis que la gp41 est non seulement responsable de la trimérisation de la protéine et de l'ancrage à la membrane du complexe gp120/gp41 mais constitue également l'élément clé qui permettra la fusion entre la membrane virale et la membrane plasmique de la cellule

au moment de l'entrée du virus dans la cellule cible (77, 139, 180, 229, 283, 320, 480, 542). Pour être infectieux, le clivage de l'Env est nécessaire au virus afin que l'Env soit compétente pour les étapes de fusion et ainsi obtenir des particules virales infectieuses. C'est l'efficacité de ce clivage qui déterminera le transport intracellulaire de l'Env et par conséquent son incorporation à la particule virale. À cet effet, seulement un très faible pourcentage (seulement de 5-15%) de l'Env mature atteint la surface de la cellule pour être incorporée au virion; le reste étant dégradé au niveau des lysosomes (544). Outre son transport inefficace à la surface de la cellule, l'Env contient également au niveau de sa queue intracytoplasmique des signaux d'endocytose qui permette son internalisation par le recrutement de la machinerie cellulaire utilisant les molécules adaptatrices de clathrine (440). Cette même machinerie est ciblée par Nef afin de médier l'internalisation du récepteur CD4 ce qui contribue davantage à la diminution de son expression à la surface de la cellule permettant à la cellule infectée d'échapper plus efficacement à la réponse immunitaire anti-HIV (377).

Des comparaisons de séquences du gène *env* d'un grand nombre d'isolats du VIH ont permis d'établir que structurellement la gp120 est organisée en 5 domaines conservés (C1-C5) séparés par 5 domaines hypervariables (V1-V5) (355, 496, 548). La structure secondaire de la gp120 est maintenue grâce à des ponts disulfures liant les différents domaines de la protéine via 9 résidus cystéines conservés (287, 304). Au niveau du Golgi, la gp120 subit de nombreuses modifications post-traductionnelles et est modifiée par l'ajout d'oligosaccharides complexes (304). Un motif YXXL situé au niveau de la queue intracytoplasmique de la gp41 est responsable du bourgeonnement polarisé du virus et permet un ciblage de l'Env aux compartiments endosomaux adéquats dirigeant ainsi l'Env mature vers les sites d'assemblage du virus à la membrane plasmique. Récemment, de nombreuses études ont mis en évidence que le VIH bourgeonne au niveau de domaines spécialisés de la cellule appelés radeaux lipidiques (65, 243, 371, 378). Il a été démontré que la palmitoylation de l'Env est critique pour son association avec les radeaux lipidiques et son incorporation subséquente à la particule virale bourgeonnante (371, 439).

8. Assemblage et bourgeonnement de la particule virale

Suite à la synthèse de toutes les protéines virales, l'assemblage du virus s'amorce. L'assemblage des rétrovirus est le résultat d'une série d'évènements menant ultimement à la formation et à la relâche de particules virales infectieuses de la cellule infectée. Suite à la traduction des précurseurs Gag et GagPol, ces protéines structurales sont ciblées à la membrane cellulaire. Leur accumulation au site d'assemblage force ainsi la membrane cellulaire à former un virion bourgeonnant qui par la suite sera relâché de la cellule. Dans cette section, les différents éléments intervenant au niveau de l'assemblage du VIH-1 (interactions Gag-membranes, Gag-Gag et Gag-ARN) seront détaillés.

8.1 Ciblage à la membrane

Les premières études fonctionnelles sur l'assemblage du VIH ont permis de démontrer que le ciblage à la membrane de Gag en constituait l'un des évènements précurseurs. Il est bien établi que la matrice (MA), qui constitue la portion N-terminale du précurseur Pr55^{Gag}, en est responsable. En effet, des mutations abolissant le ciblage aux membranes de Gag préviennent efficacement le bourgeonnement de particules virales (52, 81, 212, 299, 494, 576). Par ailleurs, ces études ont également permis de définir une région située en N-terminale et conservée chez d'autres rétrovirus dont la fonction est de permettre le ciblage membranaire de Gag; il s'agit du domaine M (550).

8.1.1 Domaine M

Le domaine M du VIH-1 se situe au niveau des 31 premiers acides aminés de la MA (576). Ce domaine est constitué de deux régions qui sont toutes deux requises pour le ciblage membranaire de Gag soit la présence d'une région acylée et d'une région riche en résidus basiques (212, 299, 494, 576). Lors de la traduction de Gag, la première méthionine de la protéine est enlevée pour permettre l'ajout d'un acide gras, le myristate, au premier résidu glycine de la protéine (22, 201, 212). Cette myristylation dépend de la présence de la séquence consensus Met-Gly-x-x-x-Ser/Thr

(428) et permet l'insertion de Pr55^{Gag} aux membranes. Quant aux résidus basiques, ils sont regroupés entre les acides aminés 17 à 31 de la MA (576). Cette portion formée d'un regroupement d'acides aminés chargés positivement permettrait, selon des études de structure et de mutagenèse de la protéine, la liaison aux membranes de Gag en interagissant avec les phospholipides du feuillet interne de la membrane plasmique (238, 344, 569, 576).

Malgré que les connaissances actuelles nous permettent de mieux définir les régions de la MA responsable du ciblage aux membranes de Gag, le mécanisme précis par lequel Pr55^{Gag} semble préférentiellement ciblé à la membrane plasmique plutôt qu'aux membranes intracellulaires demeure inconnu. Toutefois, de plus en plus d'évidences, dont les interactions décrites entre Gag et Tsg101 (protéine impliquées dans la biogénèse des corps multivésiculaires (MVB)), indiquent que le virus aurait également la capacité de bourgeonner au niveau des compartiments vésiculaires intracellulaires ceci étant particulièrement observé chez les macrophages (190, 420). Par ailleurs, des études récentes ont permis de mettre en évidence que les molécules de Gag s'accumulent préférentiellement dans des domaines spécifiques de la membrane plasmique appelés radeaux lipidiques (lipid rafts) (65, 378).

8.2 Oligomérisation de Gag

La multimérisation des molécules de Gag est à la base de la formation de la particule virale et représente une des propriétés intrinsèques de Gag puisque lorsque purifié, Gag peut former des particules présentant des propriétés structurales similaires aux virions *in vitro* (63, 64, 313, 362). L'assemblage et la formation de la particule virale représentent un processus complexe et dynamique où interviennent de multiples interactions entre les molécules de Gag impliquant divers domaines de Gag. Dans cette section, les multiples déterminants de l'oligomérisation de Gag seront décrits.

8.2.1 Domaines de multimérisation de Gag

Récemment, il a été démontré que la MA pouvait être impliquée dans l'oligomérisation de Gag. Tout d'abord, la structure cristallographique de la protéine

est trimérique (238, 345). Par ailleurs, la formation de Gag trimériques en solution est dépendante de la présence de la MA (363). Cependant, le rôle de la trimérisation de Gag lors de l'assemblage n'est pas bien défini. En effet, la substitution complète de la MA par un domaine hétérologue de ciblage à la membrane indique que le rôle de la MA serait essentiellement de cibler Gag à la membrane plasmique et que la trimérisation de la molécule ne semble pas indispensable à l'assemblage (149). Toutefois, certaines mutations de Gag au niveau de l'interface de trimérisation de la MA affectent sensiblement l'assemblage viral (364). De plus, récemment, il a été démontré que l'association de Gag aux membranes induite par la myristillation de son domaine N-terminal favorise l'assemblage et facilite la multimérisation de Gag (38). À cet effet, il est possible de croire que l'association de Gag aux membranes stabilise les interactions intermoléculaires ce qui favorise par conséquent l'oligomérisation de Gag permettant un assemblage plus efficace (457). Toutefois, le fait que Gag puisse oligomériser en absence de myristillation soulève la possibilité que l'assemblage puisse s'amorcer dans le cytoplasme pour ensuite se terminer à la membrane (363). Le second domaine de Gag impliqué dans la multimérisation de la protéine se trouve au niveau de la protéine de la capsid (CA). La capsid est le principal déterminant impliqué dans la formation du noyau dense viral puisque lorsque purifié, la CA peut s'auto-assembler pour former une structure homologue au noyau dense (67, 141). Les virions possédant des noyaux denses dont la morphologie est affectée sont incapables d'initier correctement la rétrotranscription diminuant ainsi leur potentiel infectieux (508). Donc, la capsid fournit non seulement la stabilité structurale du virion mais contribue également aux contacts protéines-protéines nécessaires à l'assemblage productif du virus. Le domaine N-terminal de la CA influence la morphologie des particules virales tandis que le domaine C-terminal agit sur l'assemblage (134); les deux régions étant séparées par une courte région flexible permettant aux deux domaines de s'orienter et de possiblement fonctionner indépendamment (28). Il a été démontré que la portion C-terminale responsable de la dimérisation de la protéine est absolument requise pour que l'assemblage se fasse correctement (36, 186). Situé à proximité du site de dimérisation de la CA se trouve le domaine MHR (major homology region) qui est conservé chez tous les rétrovirus.

Quoique très peu d'informations existent quant au rôle précis joué par le domaine MHR dans l'assemblage des particules virales infectieuses, certains résultats ont suggérés que la présence de ce domaine contribuerait, tout comme la MA, à l'attachement de p55^{Gag} aux membranes et ce, possiblement en affectant la conformation de Gag pour que ce dernier puisse s'associer correctement au site d'assemblage du virus. (140). D'ailleurs, des mutants de ce domaine affectent non seulement la structure générale du noyau dense mais également l'assemblage (134) (333). Par ailleurs, la région C-terminale de la CA comprenant le MHR est également responsable de l'incorporation du précurseur Pr160^{GagPol} (247).

Le troisième domaine de Gag impliqué dans la formation d'oligomère du précurseur p55Gag est la NC. La suppression de ce domaine entraîne une réduction considérable des interactions Gag-Gag affectant ainsi la formation et la production de particules virales (58, 171). Hormis son rôle lors de la morphogénèse virale, la NC, via son domaine I (interaction domain) représente le principal déterminant de l'incorporation de l'ARN génomique.

8.3 Encapsidation de l'ARN génomique

Au moment de l'assemblage, le VIH incorpore deux copies de son génome dans la particule virale. L'ARN génomique est incorporé grâce à un signal d'encapsidation nommé site- ψ situé au niveau de l'ARN en 5' du codon d'initiation de Gag (26). Le signal d'encapsidation du VIH est principalement composé d'une structure secondaire de l'ARN assez complexe formée de quatre tiges boucles (SL1-SL4). Toutefois, certaines séquences situées à l'extérieur de cette région sont également importantes (27). Il semblerait que la structure secondaire du site- ψ plutôt que sa séquence précise en acides nucléiques soit importante pour l'encapsidation de l'ARN génomique. Les ARN ne possédant pas cette séquence ne sont pas incorporés efficacement (26). Par ailleurs, les molécules d'ARN dimérisent via la séquence DLS (dimer linkage sequence). Cette séquence chevauche partiellement le site- ψ ce qui rend difficile l'analyse de la contribution de la dimérisation de l'ARN génomique lors de son encapsidation (218).

L'encapsidation spécifique de l'ARN génomique du VIH est médiée par une interaction survenant entre le signal d'encapsidation et le domaine NC de Gag (161, 175). L'interaction entre la NC et l'ARN génomique favorise non seulement l'encapsidation de l'ARN et sa dimérisation mais entraîne également la formation de la structure de la nucléocapside du virion (387, 410). De plus, la NC permet la stabilisation du dimère d'ARN en favorisant sa maturation (270). La nucléocapside possède deux motifs en doigt de zinc séparés par une région riche en acides aminés basiques. La NC peut se lier aux ARNs soit de manière spécifique via ses domaines en doigt de zinc ou de manière non-spécifique via son domaine basique (113). Malgré que de nombreux aspects biochimiques impliqués dans l'interaction Gag-ARN soient bien caractérisés *in vitro*, plusieurs questions demeurent quant au processus de l'encapsidation de l'ARN *in vivo*. Entre autres, on ne sait toujours pas précisément à quel moment l'ARN génomique est encapsidé lors de l'assemblage ni s'il existe une relation entre la multimérisation de Gag et l'encapsidation du génome. Toutefois, plusieurs évidences suggèrent que Gag, via la NC, se lie d'abord à l'ARN ce qui enclenche la formation d'un complexe multimérique de Gag dont la surface serait suffisamment importante pour promouvoir son association subséquente aux membranes (415). D'ailleurs, à cet effet, il est bien établi que la présence d'ARN est absolument requise lors de l'assemblage *in vitro* de Gag ou de fusion CA-NC (362, 445). De plus, un traitement à la RNase est capable d'abolir les interactions Gag-Gag (58). Par ailleurs, étant donné que le site- ψ chevauche le site d'initiation de la transcription, il a été suggéré que l'attachement de Gag au site- ψ empêcherait les ribosomes de s'y associer afin d'initier la traduction terminant ainsi la synthèse protéique et permettant le ciblage des ARN au site d'assemblage.

8.4 Incorporation de protéines cellulaires

Lors du bourgeonnement, le VIH peut incorporer de nombreuses protéines membranaires de l'hôte dont la β 2-microglobuline, le CMH-II, et la molécule d'adhésion ICAM-1 pour ne donner que quelques exemples (153, 350, 383, 458). Quoique l'incorporation de ces protéines paraisse à prime abord non-spécifique, il semblerait que leur incorporation soit régulée au niveau du site d'assemblage du

virus (383). En effet, à présent, on retrouve principalement des protéines associées aux radeaux lipidiques en association avec le virion (378). Toutefois, malgré que l'incorporation de ces protéines semblent se faire de manière passive, certaines de ces protéines nécessitent la présence d'un facteur viral afin d'être incorporées au virion. C'est le cas du CMH-II qui dépend de la présence de l'Env pour son incorporation (411). Toutefois, nous ne savons toujours pas si Env interagit directement avec le CMH-II pour initier son incorporation ou bien si tout simplement, l'Env permet de diriger le bourgeonnement à des sites de la membrane enrichis en CMH-II.

De nombreuses études suggèrent que les modifications apportées au virus par l'incorporation de protéines dérivées de la cellule par le virus au moment du bourgeonnement (69, 430) pourraient avoir un rôle à jouer dans la réplication du virus (382, 523). En effet, il a été démontré que l'incorporation du CMH-II entraîne une augmentation de l'infectivité (68). Un des mécanismes proposés pour expliquer cette augmentation de l'infectivité serait que le CMH-II permettrait d'accroître l'affinité de la particule virale lors de l'interaction avec CD4, le ligand naturel du CMH-II. De manière analogue, l'incorporation de ICAM-1 permet d'augmenter l'adhésion du virus à la cellule cible ce qui pourrait influencer la capture du virus par les cellules dendritiques folliculaires (168).

Outre ces protéines membranaires, le VIH incorpore également d'autres protéines de l'hôte à l'intérieur de la particule virale. C'est le cas de la cyclophiline A et de certaines protéines du cytosquelette dont l'actine (385, 386). L'incorporation de la cyclophiline A se fait de manière spécifique et implique une interaction avec la capsid (172, 514). Il semblerait que l'incorporation de la cyclophiline A soit nécessaire à la réplication du virus parce que la présence de la cyclophiline A favoriserait la décapsidation du virus ce qui faciliterait ainsi le processus de la rétrotranscription (321). Toutefois, les implications fonctionnelles de l'incorporation de toutes les protéines associées au virion ne sont pas toujours bien définies.

8.5 Convergence Env/Gag

Au moment de l'assemblage, il y a convergence des protéines structurales au site de bourgeonnement du virus. Le mécanisme par lequel Gag et Env se retrouvent au même endroit de la membrane plasmique fût pendant longtemps un point de questionnement de la morphogenèse virale. À présent, il existe de nombreuses évidences indiquant que Gag et Env interagissent. Tout d'abord, des études de mutagenèse de la MA et de gp41 ont permis d'identifier des mutations bloquant l'incorporation de l'Env à la particule virale (135, 173, 568). À cet effet, Murakami *et al.* ont pu identifier un mutant de la MA permettant le rétablissement de l'incorporation d'un mutant de la région cytoplasmique de gp41 suggérant fortement que l'interaction des deux protéines permet la convergence de ces déterminants structuraux au site d'assemblage (367). Par ailleurs, une interaction directe entre Gag et Env a pu être mise en évidence (105, 560).

Malgré que le bourgeonnement puisse se produire en absence d'Env, il n'est pas exclu que l'Env puisse participer au processus d'assemblage en sélectionnant précisément le site d'assemblage. En effet, l'Env a été identifié comme étant le déterminant du bourgeonnement polarisé des virions dans certains types cellulaires dont les cellules épithéliales polarisées et les cellules T (126, 317). Dans les cellules épithéliales, lorsque Gag est exprimé seul, la relâche virale se produit tant du côté basolatéral qu'apical. Par contre, en présence de l'Env, le bourgeonnement du virus est redirigé du côté basolatéral. Néanmoins, lorsqu'un signal de rétention au réticulum endoplasmique est ajouté à l'Env, le bourgeonnement n'est pas redirigé vers ce compartiment (449). Inversement, certains mutants de MA permettent quant à eux le ciblage de Gag vers les membranes des compartiments intracellulaires (149). Toutefois, les particules virales, telles qu'observées par microscopie électronique ne possèdent pas d'Env suggérant que le site de convergence entre Gag et Env ne se situe pas au niveau de ces compartiments intracellulaires.

À présent, un nombre considérable d'évidences indiquent que le VIH utilisent les radeaux lipidiques (rafts) lors du bourgeonnement (371, 378). Non seulement, la localisation de l'Env au niveau des rafts est-elle nécessaire à son incorporation à la particule virale mais Gag est également ciblé au niveau de ces domaines spécialisés

de la membrane plasmique. À cet effet, il semblerait que l'oligomérisation de Gag favorise sa localisation au niveau d'un certain type de radeaux lipidiques dont la densité est légèrement plus élevée que celle des radeaux lipidiques conventionnellement décrits ce qui suggère que les molécules de Gag oligomériques pourraient être assemblées par les mouvement latéraux de radeaux lipidiques (243, 311). Certains auteurs ont suggéré que l'accumulation de l'Env au niveau des rafts permettrait de consolider la liaison de Gag au niveau de ces domaines ce qui facilite l'oligomérisation de la molécule. Outre le VIH, une multitude de virus utilisent les radeaux lipidiques lors de l'assemblage. C'est d'ailleurs le cas du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) (402). Toutefois, malgré que la glycoprotéine de VSV (VSV-G), tout comme l'Env du VIH, se localise au niveau des rafts, il a été démontré que le VSV était incapable d'incorporer l'Env du VIH. Il semble que ce soit la longueur de la queue cytoplasmique de l'Env qui empêche son incorporation puisqu'en substituant le domaine cytoplasmique de l'Env par celui de VSV-G, le pseudotypage de VSV devient possible (258). Donc, dans l'ensemble, la plupart des études tendent à démontrer que l'Env participe au processus d'assemblage en sélectionnant précisément le site d'assemblage afin de permettre son incorporation; tout d'abord en permettant le ciblage basolatéral de l'Env et ensuite, via la palmitoylation, en ciblant l'Env aux niveaux des radeaux lipidiques. Toutefois, le mécanisme précis par lequel l'Env recrute Gag lors de l'assemblage reste à être précisé.

8.6 Bourgeonnement

La dernière étape de l'assemblage des particules virales se produit au moment où le virus se détache de la membrane de la cellule infectée. Il est maintenant clair que le bourgeonnement est un processus actif nécessitant autant la contribution de séquences virales bien spécifiques que la participation de facteurs cellulaires.

Chez le VIH, les séquences responsables du bourgeonnement efficace des particules virales sont présentes dans la protéine p6 de Gag. Des mutations de la protéine p6 empêchent le bourgeonnement et entraînent l'accumulation de particules virales à la surface de la cellule qui sont maintenues ensembles par une courte tige

(211, 248). La région de p6 responsable de la fission de la particule virale est appelé domaine L (late domain) et est composée d'un motif PTAP hautement conservé. Toutefois, chez d'autres rétrovirus, le motif PTAP est substitué, par un motif de type YxxL (virus de l'anémie équine infectieuse) ou encore PPxY (virus Mason-Pfizer et virus du sarcome de Rous) (533). Il a été démontré que ces domaines sont non seulement interchangeables mais que leur position au sein de Gag importe peu indiquant ainsi une convergence dans les mécanismes de relâche utilisés par les rétrovirus et suggérant que le domaine L ne contient pas d'informations contribuant à la structure du virus (392).

Quoique le mécanisme précis par lequel la relâche s'effectue ne soit pas encore bien compris, de nombreuses évidences suggèrent que le domaine L fonctionnerait en recrutant la machinerie d'ubiquitination de la cellule. Tout d'abord, il a été démontré que p6 pouvait être ubiquitinée (384). De plus, Schubert *et al.*, en utilisant des inhibiteurs du protéasome, ont démontré que la présence d'ubiquitines libres dans la cellule est essentielle au bourgeonnement (465). Également, il a été démontré que la protéine Tsg101 pouvait lier Gag de manière p6 dépendante (529) et que l'expression de Gag entraînait une redistribution de Tsg101 au site d'assemblage.

Tsg101 est une protéine apparentée aux enzymes E2 qui sont des protéines catalysant l'ubiquitination des protéines (301). Cependant, contrairement aux enzymes E2, Tsg101 ne possède pas de site catalytique lui permettant d'effectuer le transfert des ubiquitines vers son substrat (280). Récemment, il a été démontré que Tsg101 pouvait s'assembler afin de former un complexe de haut poids moléculaire (ESCRT-1) impliqué dans le ciblage aux lysosomes des protéines membranaires destinées à être dégradées (301). Les protéines peuvent entrer cette voie de routage cellulaire soit via l'endocytose ou via le transport vésiculaire intracellulaire. Chez la levure, il a été démontré que des mutations de Tsg101 bloquaient le transport vésiculaire de manière analogue à ce qui est observé lors du bourgeonnement du virus en absence de p6 (301).

Quoique que la présence de Tsg101 semble indispensable à la relâche, le mécanisme précis par lequel ce facteur cellulaire contribue au bourgeonnement reste à être déterminé. En effet, plusieurs questions subsistent quant à savoir comment la

machinerie d'ubiquitination permettrait le bourgeonnement plutôt que l'endocytose des virions matures. Vraisemblablement, ce phénomène suggère qu'hormis Tsg101 d'autres facteurs cellulaires seraient impliqués lors du bourgeonnement. Par ailleurs, nous ne savons toujours pas si l'ubiquitination de p6 est nécessaire afin de recruter Tsg101 ou bien si cette ubiquitination constitue une conséquence indirecte du recrutement de la machinerie d'ubiquitination au site d'assemblage.

8.7 Maturation

Lors du bourgeonnement, la protéase virale s'active et clive les précurseurs Gag et GagPol afin de générer les protéines matures (309). La protéase du VIH existe sous forme dimérique et appartient à la famille des protéases aspartiques caractérisées par la présence d'un motif Asp-Ser/Thr-Gly au niveau du site actif de l'enzyme (369). La PR ne reconnaît pas tous les sites de clivages présents au niveau des précurseurs avec la même efficacité (284, 400). Conséquemment, le clivage se fait de manière ordonnée afin de générer les virions matures. Suite au clivage des précurseurs, il se produit une réorganisation complète de la structure du virion. En effet, par microscopie électronique on peut observer que les virions dont la périphérie était initialement dense et le cœur translucide possèdent maintenant une capside centrale dense et de forme trapézoïdale (566). Il est bien établi que la maturation du virus est essentielle à son infectivité puisque des mutations prévenant la formation de la capside virale entraîne des conséquences drastiques sur l'infectivité du virus. Donc, la condensation de la capside virale représente une étape primordiale qui s'avère être indispensable afin que le virus puisse effectuer à nouveau les étapes précoces de son cycle répliatif.

9. Protéines accessoires : Vif, Vpr/Vpx et Nef

Outre les gènes *gag*, *pol* et *env* normalement retrouvés chez tous les rétrovirus, le VIH possède plusieurs cadres de lecture supplémentaires codant pour les gènes accessoires *vif*, *vpr/vpx*, *vpu* et *nef*. Ces gènes sont dits accessoires puisqu'ils ne sont pas essentiels à la réplication virale *in vitro*. Cependant, les connaissances actuelles relatives au rôle de ces protéines ont permis de mettre en

lumière l'importance de ces protéines dans la pathogenèse virale et la réplication du VIH *in vivo*. En effet, *in vivo* les protéines accessoires contribuent, comme nous le verrons, de manière non-négligeable tant à la propagation virale qu'à l'induction de la maladie.

9.1 Vif

Vif est une protéine phosphorylée de 192 acides aminés (23 kDa) qui est synthétisée tardivement lors de l'infection à des niveaux relativement élevés (490, 503). Tous les lentivirus, à l'exception du virus de l'anémie équine, expriment la protéine Vif (Viral infectivity factor) (375). L'expression de Vif est non seulement essentielle à la pathogenèse virale mais est indispensable à la réplication du VIH dans les cellules T primaires et les macrophages (86, 163, 181, 199). En culture cellulaire, des virus Vif déficient arrivent à se répliquer seulement dans certaines lignées lymphocytaires dites permissives (CEM-SS, SupT1, C8166 et Jurkat) tandis que pour d'autres lignées cellulaires, telles les cellules H9 ou MT2, l'expression de Vif est requise suggérant l'implication d'un facteur cellulaire dans la fonction de la protéine (163, 181, 492). L'analyse des hétérokaryons formés de cellules permissives et non-permissives a permis de démontrer qu'il s'agit d'un phénotype dominant et que, par conséquent, Vif agirait en empêchant ce facteur cellulaire d'interférer avec la formation de particules virales infectieuses (325, 485).

Il est généralement accepté que Vif agit lors des étapes tardives du cycle de réplication du virus afin de produire des particules virales pleinement infectieuses (31, 444, 482, 534). En absence de Vif, la rétrotranscription est affectée inhibant ainsi la formation de l'ADN proviral dans la cellule infectée (35, 204, 492). Récemment, plusieurs groupes ont simultanément élucidé comment Vif pouvait contribuer non seulement à l'infectivité du VIH mais également au processus de la reverse transcription. Les auteurs ont démontré que Vif interagit avec une protéine cellulaire, APOBEC3G, ce qui prévient son incorporation dans la particule virale. APOBEC3G (CEM15) est une déaminase de l'ADN qui lorsqu'incorporée à la particule virale induit, au moment de la rétrotranscription, la déamination des cytosines en uraciles

du premier brin d'ADNc ce qui par conséquent introduit des mutations au niveau du second brin qui lui, sert de matrice à la synthèse des gènes viraux (342). Outre son effet sur le VIH, APOBEC3G peut agir sur un vaste groupe de rétrovirus dont MLV. Ainsi, l'introduction massive de ces hypermutations pourraient constituer un mécanisme général de défense innée cellulaire contre de nombreux groupes de pathogènes puisque la présence de ces mutations contribuent au recrutement des composantes d'excision de la machinerie de réparation de l'ADN ce qui entraîne l'élimination des intermédiaires de réplication et leur destruction (228, 298, 336, 342, 479). De plus, il est possible de croire que lorsque le VIH se réplique dans des cellules exprimant APOBEC3G, l'expression de Vif permet d'éviter l'accumulation de mutations aux niveaux des gènes des protéines structurales, enzymatiques et régulatrices du virus qui autrement pourraient affecter diverses étapes du cycle de réplication du virus.

9.2 Vpr/Vpx

La protéine Vpr est une protéine de 14 kDa qui comporte 96 acides aminés et qui est incorporée à la particule virale (98). L'expression de Vpr est conservée non seulement chez le VIH-1 mais également chez le VIH-2 et le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) (118, 423). Les fonctions de la protéine Vpr du VIH-2 sont partiellement différentes de celles du VIH-1, ainsi, le VIH-2 code pour une protéine additionnelle nommée Vpx (477, 524). Cette protéine, analogue à Vpr, fonctionne de concert avec cette dernière afin de médier les activités combinées de la protéine Vpr du VIH-1. Quoique l'expression de Vpr ne soit pas indispensable lors de la réplication du VIH dans les cellules T en division (118), Vpr joue un rôle primordial lors de la réplication du virus *in vivo* (198). En effet, lors de l'infection du macaque par un virus possédant un codon stop prématuré dans le gène de *vpr*, le virus recouvre rapidement un cadre de lecture fonctionnel ce qui indique qu'il existe une forte pression sélective afin de conserver l'expression de Vpr (293). De plus, l'absence de Vpr ou de Vpx lors de l'infection affecte sévèrement la propagation virale retardant ainsi les conséquences pathogéniques liées à l'infection (127, 198).

Par ailleurs, il a été observé que la fréquence d'apparition d'une mutation de Vpr abolissant l'induction de l'apoptose était plus élevée chez des patients dont le développement de la maladie est retardé (322).

La protéine Vpr possède plusieurs activités biologiques pouvant expliquer comment la protéine contribue à la pathogenèse virale *in vivo*. Tout d'abord, il a été démontré que Vpr induit un arrêt du cycle cellulaire en G2 (305, 433). Puisque la phase G2 du cycle cellulaire favorise la synthèse protéique, il a été suggéré que cet arrêt du cycle cellulaire en G2 contribue indirectement à la réplication virale en augmentant l'activité transcriptionnelle du LTR du VIH ce qui par conséquent entraîne une synthèse accrue des protéines virales (203, 565). Ensuite, grâce à sa présence au niveau du complexe de pré-intégration, Vpr facilite l'infection des cellules quiescentes tels les macrophages en favorisant le transport nucléaire du complexe de pré-intégration vers le nucléoplasme de la cellule infectée (233). En effet, Vpr, en interagissant avec l'importine- α , permet de consolider non seulement l'interaction entre l'importine- α et les signaux de localisation nucléaire présent au niveau de la matrice mais permet également de stabiliser le complexe d'import nucléaire en empêchant la dissociation de l'importine- β au niveau des pores nucléaires (413, 414, 532). Par ailleurs, Vpr est capable d'induire l'apoptose des cellules infectées (15, 500). Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer comment Vpr augmente la mort cellulaire. Tout d'abord, il semblerait que Vpr puisse agir directement en perméabilisant les membranes mitochondriales ce qui a pour effet de permettre le relâchement des cytochromes c et d'activer la cascade des caspases menant à l'apoptose de la cellule (255, 256, 501). Par ailleurs, il a été suggéré que Vpr pourrait également induire l'apoptose des cellules infectées en inhibant l'activité de NF- κ B ce qui résulte en une diminution de l'expression de facteurs anti-apoptotique comme Bcl-2 (15, 273, 422). Outre ces activités, Vpr pourrait également contribuer au processus de la rétrotranscription. En effet, Vpr pourrait possiblement recruter certaines enzymes de la machinerie de réparation de l'ADN : dans le système deux-hybrides, Vpr interagit avec l'ADN uracile glycosylase (UDG) et HHR23A, (39, 474, 552). Quoique ces interactions n'aient été détectées que dans la levure, on peut supposer que le recrutement de ces enzymes au

niveau du complexe de pré-intégration pourrait permettre d'augmenter la fidélité de la rétrotranscription. Toutefois, on ne sait toujours pas comment Vpr pourrait modifier l'activité de ces protéines et leur rôle en tant que médiateur de l'effet anti-mutagène de Vpr demeure hypothétique. Ainsi, de par ces multiples fonctions, Vpr joue un rôle critique tant au niveau des phases précoces que tardives lors de l'infection par le VIH favorisant par conséquent la réplication du virus *in vivo*.

9.3 Nef

Nef constitue un des principaux déterminants de la pathogénicité du VIH et du SIV. En effet, il a été démontré que des délétions introduites dans la protéine réduisaient considérablement la pathogénicité du SIV lors de l'infection du macaque (268). De plus, lors de l'infection du macaque par un virus possédant un codon stop prématuré dans le gène de *nef*, le virus recouvre rapidement un cadre de lecture fonctionnel ce qui indique qu'il existe une forte pression sélective afin de conserver l'expression de Nef (268). Par ailleurs, chez les patients, une corrélation directe est observée entre l'infection par un virus défectif pour l'expression de Nef et un ralentissement important de la progression de la maladie (116, 274, 297). Ainsi, les mécanismes par lesquels Nef optimise la réplication du virus pourraient contribuer à la pathogénèse associée au VIH.

Le gène codant pour Nef est exprimée à partir d'un ARNm qui a subi de multiples épissages et est situé à l'extrémité 3' du génome dans une région chevauchant partiellement le LTR du VIH (110, 277). Nef est exprimé précocement lors de l'infection et quelques évidences récentes suggèrent même que la transcription du gène s'amorcerait avant l'intégration complète du génome viral (559). Nef est une phosphoprotéine de 27 kDa dont l'association aux membranes dépend de la myristilation de son domaine N-terminal. Malgré que la localisation cellulaire de Nef soit principalement cytoplasmique, il apparaît que la myristilation de la protéine entraînant sa relocalisation au niveau de la membrane plasmique et du cytosquelette soit essentielle à la plupart des activités biologiques de la protéine (88,

150, 263, 398, 536). Par ailleurs, il a été démontré que Nef était incorporé à la particule virale (282). Toutefois, les implications de cette incorporation pour la réplication du virus restent à être élucidées.

Lors de la réplication du VIH, Nef possède plusieurs fonctions pouvant expliquer son rôle dans la pathogenèse du VIH. Premièrement, Nef diminue l'expression de surface du récepteur CD4 en accélérant l'endocytose de la molécule par le recrutement de la machinerie cellulaire utilisant les molécules adaptatrices de clathrine et en ciblant subséquentement CD4 au niveau des lysosomes où la molécule sera dégradée (5, 189, 219, 403, 404). Il est maintenant bien établi que la diminution de l'expression de surface de CD4 contribue à la relâche de particules virales infectieuses en prévenant la rétention des particules bourgeonnantes à la surface de la cellule infectée et en permettant à l'Env d'être incorporée efficacement lors du bourgeonnement (11, 104, 291, 437). Ensuite, Nef régule sélectivement l'expression de certains allèles du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) ce qui permet d'échapper efficacement à la réponse immunitaire (100, 101, 469, 549). De plus, Nef contribue à la signalisation et à l'activation cellulaire (483). À cet effet, Nef contient un domaine de liaison pour les domaines SH3 (Src homology region) ce qui lui permet d'interagir avec une variété de kinases cellulaires modifiant ainsi leur activité (151, 337). Par ailleurs, il semblerait que la localisation de Nef au niveau des radeaux lipidiques contribuerait à l'effet de Nef sur l'activation cellulaire (536). Finalement, Nef contribue à l'infectivité virale (88). Cet effet de Nef sur l'infectivité du VIH est non seulement attribuable, comme nous l'avons mentionné, à son effet sur l'expression de surface de CD4, mais de manière indépendante, à l'augmentation de l'efficacité de la synthèse de l'ADN proviral induite par Nef (6, 87, 468). Par ailleurs, des travaux récents ont suggéré que Nef augmente l'infectivité virale en accroissant la synthèse et le transport du cholestérol au niveau des radeaux lipidiques (574, 575). Donc, globalement, Nef contribue à la pathogenèse virale en modifiant l'environnement cellulaire de l'hôte afin d'optimiser la réplication du virus.

10. Vpu

10.1 Expression et structure

Vpu, contrairement aux autres protéines accessoires, est unique au VIH-1 et à quelques isolats simiens dont le SIV_{cpz} (99, 250, 347, 505). Dernièrement, la présence d'un cadre de lecture ouvert codant pour Vpu a pu également être mis en évidence chez d'autres espèces simiennes (20, 106). Le VIH-2 ainsi que la plupart des virus de l'immunodéficience simienne ne possède pas de protéine analogue à Vpu (224, 250).

Le gène codant pour Vpu est situé dans la région centrale du génome du VIH et chevauche partiellement l'extrémité 5' du gène de l'*env* (99). En fait, Vpu et Env sont exprimés de manière Rev-dépendante à partir du même ARNm bicistronique où l'*env* est traduite suite à la non-reconnaissance du codon d'initiation de *vpu* par les ribosomes (12, 471, 472). Ainsi, cet arrangement inhabituel du transcrit permet l'expression simultanée de Vpu et du précurseur gp160 de l'Env reflétant probablement la nécessité d'une action concertée des deux protéines lors du cycle de réplication du virus. Quelques isolats du VIH possèdent des mutations ponctuelles au niveau du codon d'initiation de *vpu* et ce, malgré que le gène de *vpu* demeure intact (99). L'élimination du codon d'initiation de *vpu* entraîne une augmentation de l'expression du gène de l'*env* situé en aval (498). Donc, il est possible que le VIH utilise ce mécanisme afin de réguler l'expression relative de Vpu et Env dans la cellule infectée.

Vpu est une protéine transmembranaire de type I composée de 81 acides aminés (16 kDa) et qui est capable d'homoligomérisation (330, 504, 505). La protéine est constituée d'un domaine N-terminal hydrophobe permettant son ancrage aux membranes et d'un domaine C-terminal cytoplasmique hydrophile (330). Étant donné qu'il s'agit d'une protéine membranaire, la résolution exacte de la structure représente un défi technique assez important. Des études de résonance magnétique nucléaire (NMR) ont permis d'établir que la structure tridimensionnelle de Vpu comporte 3 hélices α reliées entre elles par des boucles (160, 236, 554, 555). L'hélice 1 située en N-terminal permet l'insertion de la protéine aux membranes. L'inclinaison de l'insertion serait d'environ 33° par rapport à la bicouche lipidique (555). Le domaine cytoplasmique comporte deux hélices (l'hélice 2 composée des

résidus 37-51 et l'hélice 3, des résidus 57-72) qui sont séparées par une région charnière flexible comportant les deux sites de phosphorylation de la protéine en position 52 et 56 (Fig. 8)(160, 464). Quoique de nombreux progrès aient été réalisés concernant l'élucidation de la structure de Vpu, à présent on ne sait toujours pas comment les deux hélices cytoplasmiques sont orientées. En effet, malgré que les études de NMR suggèrent une orientation parallèle à la membrane pour la première hélice, nous ne savons toujours pas comment les deux hélices interagissent l'une par rapport à l'autre. Toutefois, certaines études ont suggéré que la phosphorylation de la protéine pourrait éventuellement affecter la flexibilité de la région charnière et ainsi permettre le repliement de l'hélice 3 sur l'hélice 2 (236). Ainsi, de manière analogue à Nef, il est possible que le domaine cytoplasmique de Vpu adopte différente conformation selon le partenaire cellulaire à recruter ou encore, la fonction à accomplir.

Vpu est retrouvée en association avec les membranes des cellules infectées et n'a pu être détectée dans les surnageants de culture ce qui suggère que Vpu n'est pas incorporée à la particule virale (504). Dans la cellule, des analyses d'immunohistochimie ont permis d'établir que Vpu se localise de façon prédominante en périphérie nucléaire au niveau du réticulum endoplasmique. Toutefois, certaines évidences semblent suggérées que la protéine pourrait également se retrouver à la surface de la cellule. Cependant, ces études sont à considérer avec une certaine réserve puisque dans le premier cas, Vpu n'a pu être détecté à la surface que lorsqu'en fusion avec le domaine extracellulaire de CD4 ne permettant pas de déterminer la contribution de CD4 dans le ciblage de Vpu à la membrane (418). Par ailleurs, dans la deuxième étude, c'est un mutant de Vpu qui fût détecté à la surface par co-immunoprécipitation avec CD4 soulevant la possibilité que CD4 soit responsable de cette localisation en surface de Vpu (41). Toutefois, comme nous le verrons, la localisation post-RE de Vpu semble essentielle lors de la fonction de relâche facilitée de la protéine.

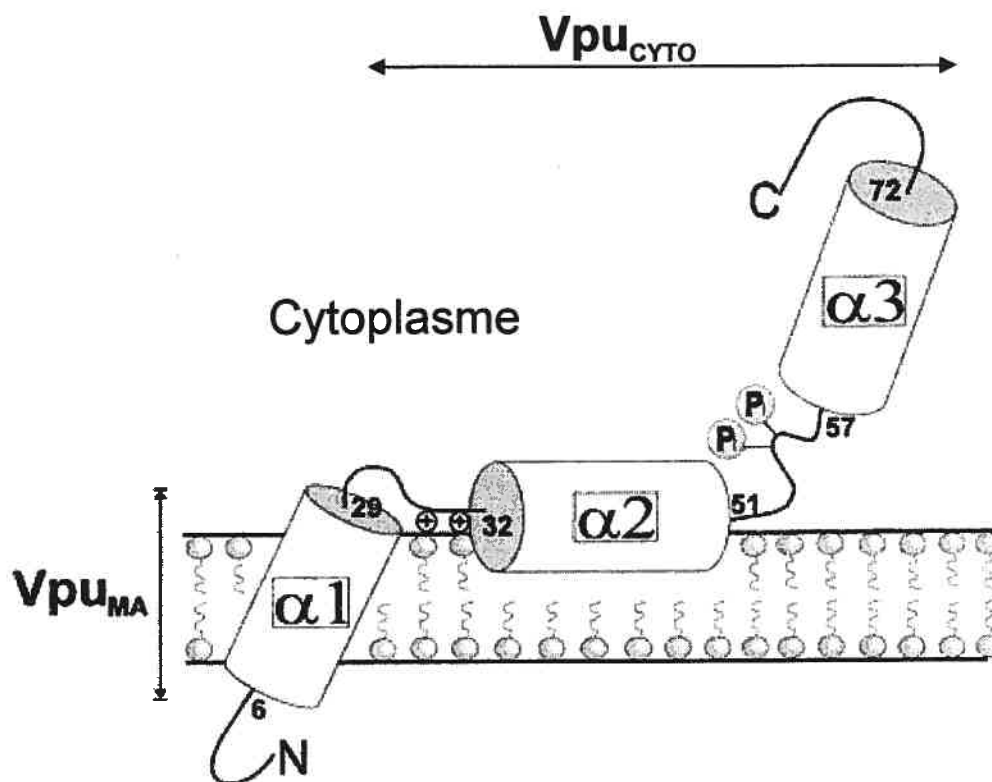


Figure 8. Modèle hypothétique de la structure de Vpu. Vpu est une protéine transmembranaire de 81 acides aminés. La protéine est constituée d'un domaine N-terminal responsable de son ancrage à la membrane (Vpu_{MA}) et de deux hélices- α cytoplasmiques hydrophiles (Vpu_{CYTO}). L'hélice 2 et l'hélice 3 sont séparées par une région charnière flexible comportant les deux sites de phosphorylation de la protéine situés position 52 et 56. Reproduit de V. Wray *et al.* 1999. *Biochemistry*. **38**:5272-82.

10.2 Fonctions

Vpu possède deux activités biologiques principales impliquant deux régions distinctes de la protéine (461). Tout d'abord, Vpu facilite la relâche des particules virales de la cellule infectée (505, 513). Ensuite, Vpu induit la dégradation du récepteur CD4 et possiblement des molécules du CMH-I au niveau du réticulum endoplasmique (267, 547). Outre ces deux fonctions de Vpu, il a par ailleurs été démontré que l'expression de la protéine entraînait une diminution de la formation des syncytia. Finalement, l'expression de Vpu est également associée à l'induction de l'apoptose des cellules infectées. Les sections qui suivent reprennent en détails les diverses fonctions de la protéine Vpu.

10.2.1 Dégradation du récepteur CD4

L'induction de la dégradation du récepteur CD4 au niveau du RE représente la fonction de Vpu la mieux caractérisée. Au cours des étapes tardives de la réplication virale, le précurseur gp160, du à son affinité élevée pour le récepteur, retient les molécules de CD4 néosynthétisées au niveau du RE. La rétention de CD4 au niveau du RE est probablement la conséquence indirecte du transport inefficace de la gp160 (544). Ce phénomène prend davantage d'importance tardivement au cours de l'infection au moment où la glycoprotéine gp160 est exprimée à de très hauts niveaux. Les complexes gp160-CD4 ainsi formés non seulement préviennent l'expression de surface de CD4 mais bloquent la maturation et le transport de la gp160 (108, 253, 266, 499). Toutefois, en présence de Vpu, il se produit une dissociation de l'Env du complexe CD4/Env accompagnée d'une diminution rapide de l'expression de CD4 détectable dans la cellule (272, 546, 547). Ainsi, Vpu régule la demie-vie du récepteur CD4 dans le RE en induisant la dégradation spécifique de CD4 ce qui libère la gp160 qui sera transportée plus efficacement vers le Golgi. Il est nécessaire que CD4 soit retenu dans le RE afin que la dégradation puisse se produire. Lors de l'infection, cette rétention est généralement obtenue grâce à la présence de l'Env. Toutefois, *in vitro*, il est tout de même possible d'étudier la dégradation de CD4 induite par Vpu pour autant que CD4 soit retenu artificiellement dans le RE soit par la présence de signaux de rétention au RE ou encore en traitant les cellules avec

de la Brefeldin A (BFA), un métabolite fongique bloquant le transport des protéines du RE vers le Golgi (303, 546).

L'induction de la dégradation de CD4 est un processus multiphasique initié par l'interaction directe de Vpu avec la queue cytoplasmique de CD4. Des études de mutagenèse ont permis de démontrer que la région entourant les résidus 418 à 425 de CD4 ainsi que la préservation d'une structure en hélice α de cette région étaient nécessaires afin que Vpu puisse se lier à CD4 (43, 303, 545, 561). D'ailleurs, le transfert des acides aminés 403 à 420 de la région proximale à la membrane de CD4 à la queue cytoplasmique de CD8 est suffisant pour induire la dégradation de ce récepteur qui normalement n'est pas susceptible à l'effet de Vpu (545).

Des études de mutagenèse de Vpu ont permis d'établir que l'intégrité de la première hélice cytoplasmique de Vpu doit être préservée afin que Vpu puisse s'associer à CD4 (340, 517). De plus, l'interaction de Vpu avec la queue cytoplasmique de CD4 est absolument requise mais non suffisante afin que Vpu puisse induire la dégradation du récepteur (43). À cet effet, ces études ont permis d'identifier des mutants de Vpu pouvant toujours s'associer à CD4 mais incapable d'initier sa dégradation. Plus encore, la phosphorylation des résidus Sérines 52 et 56 quoiqu'essentielle à la dégradation de CD4, ne semble pas requise pour l'association de Vpu à CD4 (43, 174). D'ailleurs, Margottin *et al.* ont démontré que Vpu ciblait CD4 vers la machinerie de l'ubiquitine-protéasome due à une interaction directe des phosphosérines de Vpu avec β -TrCP, une protéine faisant partie du complexe ubiquitine ligase E3 (341). Ces résultats combinés avec les résultats des études utilisant des inhibiteurs du protéasome démontrent clairement que Vpu, pour induire la dégradation de CD4, sert de pont en se liant tout d'abord à CD4 pour ensuite recruter la machinerie de l'ubiquitine-protéasome (176, 460). Des analyses de comparaison de séquences ont permis de mettre en lumière un motif consensus présent chez d'autres protéines dont la β -caténine et $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ dont la phosphorylation des Sérines est nécessaire au recrutement de β -TrCP (292). Cependant, contrairement à ces protéines, Vpu n'est pas dégradé suite au recrutement de la machinerie de dégradation de CD4. Toutefois, des études supplémentaires seront requises afin de déterminer si l'interaction de Vpu avec CD4 et le recrutement subséquent de la

machinerie du protéasome sont suffisant pour induire la dégradation de CD4 ou encore pour déterminer le mécanisme précis par lequel CD4 est dégradé, à savoir par exemple si la dégradation de CD4 nécessite une translocation du récepteur du RE vers le cytoplasme. Par ailleurs, vu la similitude du motif de phosphorylation de Vpu et de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, il est possible que la kinase de $\text{I}\kappa\text{B}$ soit également responsable de la phosphorylation de Vpu. Toutefois, ceci reste à vérifier.

10.2.2 Augmentation de la relâche de particules virales

Une des premières activités biologiques associées à l'expression de Vpu fût l'augmentation de la relâche des particules virales de la cellule infectée (505, 513). Phénotypiquement, l'absence de relâche se manifeste par le bourgeonnement de particules virales au niveau des membranes internes ainsi que par une augmentation des virions toujours associées à la cellule. De plus, en absence de Vpu, non seulement une grande proportion des particules virales se retrouvent toujours en association avec la cellule infectée mais on retrouve également des différences significatives de taille et de morphologie résultant quelques fois en la formation de particules virales possédant plusieurs capsides (276, 562). Par conséquent, il semblerait que Vpu facilite non seulement la relâche des particules virales mais contribue à la morphogenèse virale. Toutefois, la fonction de relâche de Vpu n'est pas dépendante de la maturation des virions puisque Vpu peut toujours augmenter la relâche des particules et ce, que la protéase soit présente ou non (210).

Cette fonction de Vpu est médiée par la portion transmembranaire de la protéine et il a été suggéré que cette fonction aurait lieu dans un compartiment post-RE (44, 395, 515). La relâche facilitée est indépendante de la présence de CD4 et de l'Env (563). Il a également été démontré que Vpu pouvait induire l'augmentation de la relâche de particule virale de Gag provenant de virus hétérologues tels que le virus Visna et le virus de Moloney de la leucémie murine (MoMuLV) (210). Ainsi, il est possible de croire que Vpu pourrait médier l'augmentation de la relâche de particule virale en agissant soit sur un domaine de Gag commun aux divers rétrovirus ou encore en modifiant une voie cellulaire permettant le ciblage plus efficace de Gag aux membranes. Par ailleurs, le groupe de Panganiban a pu identifier une protéine

cellulaire qui interagit non seulement avec Vpu, mais également avec Gag (UBP: Vpu-binding protein) (60). Leur étude démontre qu'en présence de Vpu, la liaison de Gag à UBP est diminuée (60). De plus, des analyses d'histoimmunochimie ont montrées que la co-expression de Vpu entraîne une redistribution de Gag et UBP à la membrane plasmique (226). D'autre part, il apparaît que la région N-terminal de Gag contenant les domaines d'attachement aux membranes de Gag soit nécessaire à l'effet de Vpu. De plus, il semblerait qu'en présence de Vpu, le ciblage membranaire d'une fusion GFP-MA soit augmenté (124). Donc, il serait intéressant de déterminer si UBP interagit avec les molécules de Gag des autres rétrovirus et d'identifier les domaines de Gag nécessaires à cette interaction afin d'identifier un domaine structural de Gag qui serait communs aux divers rétrovirus les rendant ainsi sensibles à l'effet de Vpu.

Vu les nombreuses activités biologiques de Vpu, il est tout de même surprenant que cette protéine soit quasi-unique au VIH-1 et ce, d'autant plus que Vpu a la possibilité de faciliter la relâche de Gag de virus hétérologues n'exprimant pas Vpu (210). Donc, des études concernant l'efficacité de la relâche des particules virales du VIH-2, ont permis d'établir que l'Env du VIH-2 posséderait une fonction analogue à la fonction de relâche de Vpu (42, 44, 429). Par ailleurs, les déterminants précis responsables de cette fonction restent à être identifiés.

10.2.3 Vpu : un canal ionique ?

Vpu possède des homologies structurales avec la protéine M2 du virus de l'Influenza; toutes deux sont des phosphoprotéines membranaires capables d'oligomérisation (244, 330, 504). Vu la fonction de canal ionique de M2, il a été proposé que Vpu pouvait également s'associer pour former un canal ionique (148, 245, 463). Tout d'abord, la protéine Vpu recombinante (exprimée dans *E. coli*) lorsqu'incorporée dans une bicouche lipidique peut produire un canal ionique dont la conductance varie entre 15 et 280pS. La spécificité de ce canal ionique est légèrement plus prononcée (environ 5X) pour les ions Na^+ que pour les Cl^- (148). De plus, la même sélectivité pour les cations a été obtenu lorsque Vpu est exprimé dans les oocytes de grenouilles (463). Par ailleurs, selon ces mêmes auteurs, il semble

y avoir une corrélation entre la capacité de Vpu à faciliter l'augmentation de la relâche de particules virales et l'induction d'un courant dans les oocytes puisqu'un mutant de Vpu dont le phénotype de relâche est affecté due à la séquence de sa région transmembranaire qui a été randomisée perd également sa capacité à induire un courant dans les oocytes. Ainsi, la région transmembranaire de la protéine serait responsable de la formation d'un canal ionique. À cet effet, Schubert *et al.* ont mis en évidence qu'un peptide synthétique correspondant à la région transmembranaire de la protéine pouvait également induire un courant et ce, contrairement au peptide analogue dont la séquence est randomisée (463).

Toutefois, ces études ont été mises en doute par Coady *et al.* (94) qui n'ont pu observer cet effet de Vpu. Les auteurs proposent que les mesures de l'activité de canal ionique associée à Vpu représenterait un courant non-spécifique lié à l'insertion inadéquate de Vpu dans les membranes (521) ou encore serait le résultat de l'induction d'une conductance de type HANC (« hyperpolarisation-activated non specific cation current »). Ce type de courant est fréquemment observé chez les oocytes de *Xenopus* et constitue une mesure non-spécifique et non attribuable à l'expression de la protéine Vpu a proprement parlé. Par contre, ces auteurs ont tout de même pu observer une variation de la conductance des ions K^+ suggérant que Vpu pourrait agir sur une voie de transport de ce canal ionique endogène.

Quoiqu'il en soit, nous ne connaissons toujours pas par quel mécanisme l'activité de canal ionique de Vpu pourrait faciliter le détachement des particules virales de la surface de la cellule ni comment cette fonction pourrait permettre le recyclage des virions bourgeonnants au niveau des membranes internes vers la membrane plasmique. Gonzalez *et al.* ont suggéré que Vpu pourrait agir sur la relâche des particules virales de manière analogue à la protéine 6K du virus Semliki en formant des pores qui modifieraient la perméabilité des membranes (206, 207, 455). Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer si vraiment Vpu possède une fonction de canal ionique afin de mieux comprendre les mécanismes de la relâche facilitée. De manière alternative, il serait également intéressant de déterminer si Vpu permet la relâche facilitée en agissant, comme il a

été suggéré, sur le transport d'une protéine qui, quant à elle, posséderait l'activité de canal ionique.

10.2.4 Effets cytopathiques sur la cellule

10.2.4.1 Formation de syncytium

In vitro, la présence de cellules multinuclées constitue la caractéristique phénotypique des souches SI. Quoique facilement observées *in vitro*, il apparaît relativement difficile d'observer ces cellules *in vivo*. En effet, *in vivo*, ce type de cellules est non seulement plutôt rare mais généralement de taille beaucoup moins importante que ce qui est observé *in vitro*. Les syncytia étant généralement très fragiles, il est probable qu'il soit difficile de les observer *in vivo* due à leur lyse prématurée avant qu'ils ne puissent atteindre une taille suffisamment grande pour être observés facilement. Par ailleurs, la courte demie-vie des cellules infectées complique l'observation de ce type d'effet cytopathique lié à l'infection par le VIH. Jusqu'à ce qu'une étude utilisant des tissus lymphoïdes mette en évidence que les lymphocytes infectés pouvaient fusionner résultant en la formation de syncytia possédant jusqu'à cinq noyaux (380), l'origine exacte de ces cellules multinuclées était incertaine. Il avait été suggéré que les cellules Warthin-Finkeldey communes aux hyperplasies ganglionnaires observées chez les patients infectés pouvait représenter l'équivalent *in vivo* de ce qui était observé *in vitro* (381). Il s'est avéré que ce n'était pas le cas. À cet effet, l'étude de Orenstein constitue une des premières évidences montrant que les cellules multinuclées originent de la fusion de lymphocytes infectés par le VIH *i.e.* positifs pour l'expression de la p24 par immunohistochimie suggérant ainsi une implication directe de l'infection virale dans la formation de syncytia.

En présence de Vpu, on observe une diminution importante de la formation des syncytia ainsi qu'un retard de l'apparition des effets cytopathiques. Il semblerait que ce phénomène soit une conséquence du faible niveau d'Env exprimé à la surface de la cellule due à la relâche facilitée des virions en présence de Vpu (252). Outre la relâche facilitée, il est également possible que conséquemment à l'élimination du

codon d'initiation de *vpu*, l'augmentation de l'expression du gène de l'*env* puisse également faciliter la formation de syncytium (498). Donc, il est envisageable que le VIH, par l'expression de Vpu, régule les niveaux d'Env disponibles réduisant ainsi les effets cytopathiques liées à l'infection ce qui retarde la mort cellulaire et favorise par conséquent la propagation virale. Par ailleurs, une réduction de l'expression de l'Env permet également à la cellule infectée d'échapper efficacement à la réponse immunitaire.

10.2.4.2 Induction de l'apoptose

L'infection par le VIH entraîne une destruction massive des lymphocytes T CD4⁺ (159). Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer l'éradication de ces cellules dont l'apoptose. À cet effet, le laboratoire du Dr Finkel a mis en évidence que l'expression de Vpu augmentait la susceptibilité des cellules infectées à l'induction de l'apoptose par Fas (70, 419). D'un point de vue mécanistique, il semblerait que Vpu prévienne l'activation de NF- κ B en interférant avec la dégradation de I κ B induite par β -TrCP (40). Afin que NF- κ B puisse être actif, I κ B doit être dégradé pour ainsi permettre l'exposition du signal de localisation nucléaire de NF- κ B (121). Vpu, afin d'induire la dégradation de CD4, détourne β -TrCP ce qui par conséquent empêche la dégradation de I κ B et ce, d'autant plus que Vpu reste stable lors du recrutement de β -TrCP. Donc, Vpu en empêchant la translocation nucléaire de NF- κ B se trouve à inhiber l'expression des facteurs anti-apoptotiques tel Bcl-xL (7).

10.2.5 Vpu et la pathogenèse associée au VIH-1

Malgré que l'expression de Vpu ne soit pas requise pour la réplication du virus *in vitro*, il apparaît de plus en plus évident que Vpu, de par ses fonctions de relâche et de dégradation, contribue à la pathogenèse *in vivo*. Tout d'abord, des analyses sérologiques ont permis de démontrer que la séroprévalence des anticorps dirigés contre Vpu augmentait au fur et à mesure que les individus infectés progressaient vers la maladie suggérant que l'expression de la protéine est conservée *in vivo* et joue probablement un rôle dans la pathogenèse virale et dans le développement de la

maladie (427). Ensuite, il a été démontré que des macaques infectés avec un virus chimère de l'immunodéficience humaine et simienne (SHIV) déficient pour l'expression de Vpu avaient une charge virale nettement inférieure qu'en présence de Vpu et que ces virus étaient moins pathogènes (316, 498). Par ailleurs, l'acquisition de la pathogénicité d'une souche initialement non-pathogénique (SHIV-4) est associée avec un rétablissement rapide de la fonctionnalité de Vpu (324, 348). De plus, des résultats non publiés ont permis de confirmer davantage l'importance de la dégradation de CD4 dans l'infection par le VIH. En effet, en utilisant le modèle SHIV, Griffin *et al.* ont démontré que la progression de la maladie était significativement retardée lorsque les sites de phosphorylation 52 et 56 étaient mutés. Donc, *in vivo*, il semblerait que les fonctions de relâche et de dégradation du récepteur CD4 soit requise afin que Vpu puisse contribuer de manière optimale à la pathogenèse virale ainsi qu'au développement de la maladie.

11. Problématique et objectifs

Vpu possède au moins deux principales activités biologiques soient l'induction de la dégradation du récepteur CD4 au niveau du réticulum endoplasmique et l'augmentation de la relâche de particules virales (504, 513, 546). La dégradation de CD4 se produit au niveau du réticulum endoplasmique où Vpu se lie à la queue cytoplasmique de CD4 permettant le recrutement de β -TrCP qui via son interaction avec Skp1-p dirigera CD4 vers la dégradation impliquant la voie ubiquitine-protéasome (341). Cette fonction de Vpu est médiée par des déterminants de la portion cytoplasmique de la protéine et est dépendante de la phosphorylation des sérines situées en position 52/56 (174, 466). Lors de l'infection par le VIH-1, plusieurs protéines virales, dont Nef, Env et Vpu, entraînent une diminution importante de l'expression de surface du récepteur viral CD4 (82). De récentes études ont permis de mettre en évidence que la diminution de l'expression de CD4 médiée par Vpu et/ou Nef joue un rôle dans la réplication virale permettant de croire que l'expression de CD4 pourrait être un important régulateur de la pathogénèse associée

au VIH-1 (41, 104, 291, 437). Toutefois, le mécanisme par lequel la modulation négative du récepteur CD4 et spécifiquement comment Vpu contribuerait à la pathogenèse virale demeure encore mal défini. Ainsi, un des objectifs des travaux de ma thèse est de mieux comprendre le rôle de la dégradation du récepteur CD4 médiée par Vpu dans le cycle de réplication du VIH-1 et d'élucider par quel mécanisme la dégradation du récepteur CD4 contribue à la pathogenèse virale.

Quant à la fonction de relâche, elle est médiée par la portion transmembranaire de la protéine et il a été suggéré que cette fonction aurait lieu dans un compartiment post-ER (466). Cette fonction de Vpu est indépendante de la présence de CD4 et de Env (563). Il a également été démontré que Vpu pouvait induire l'augmentation de la relâche de particule virale de Gag provenant de virus hétérologues tels que le virus Visna et le virus de Moloney de la leucémie murine (MoMuLV) (210). Ainsi, il est possible de croire que Vpu pourrait médier l'augmentation de la relâche de particule virale en agissant soit sur un domaine de Gag commun aux divers rétrovirus ou encore en modifiant une voie cellulaire permettant le ciblage plus efficace de Gag aux membranes. Par ailleurs, des études de microscopie électronique ont démontrés qu'en absence de Vpu, les particules virales présentaient des morphologies aberrantes. En effet, dans ces conditions, une grande proportion des particules virales se retrouvent toujours en association avec la cellule et montrent des différences significatives de taille et de morphologie résultant quelques fois en la formation de particules virales possédant plusieurs capsides (276, 562). Quoique les mécanismes de la dégradation de CD4 médiée par Vpu lors de l'infection par la VIH-1 soient mieux compris, les mécanismes sous-jacents l'augmentation de la relâche de particule virale restent à être élucidés. Dans la deuxième partie de mes travaux, nous nous sommes surtout intéressés à la seconde fonction de Vpu soit l'augmentation de la relâche. Ainsi, le principal objectif de cette partie de mes travaux est d'étudier le rôle de Vpu dans la morphogenèse virale et de mieux comprendre son importance dans le processus de relâche de particules virales à partir de la cellule infectée.

Finalement, la dernière partie de mes travaux porte de manière indépendante sur la molécule CD4. La molécule CD4 est une glycoprotéine d'environ 58 KDa

exprimée principalement à la surface des thymocytes, des lymphocytes T auxiliaires, des macrophages, des monocytes et des cellules de Langherans. Cette protéine transmembranaire est composée de 4 domaines extracellulaires (D1 à D4) présentant une homologie avec la superfamille des immunoglobulines, d'une région transmembranaire et d'une courte queue intracytoplasmique (45). La structure cristallographique de D1 à D4 de la molécule prédit un site d'homodimérisation situé en D4 (556). Outre ses fonctions lors de la réponse immunitaire, CD4 a été identifié comme étant un des récepteurs du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) (112, 275, 352). Récemment, des travaux ont permis de démontrer que la molécule CD4 existait *in vivo* sous forme dimérique. Toutefois, les régions de CD4 nécessaire à cette dimérisation ainsi que son rôle dans la réplication du VIH-1 ne sont pas connus. Ainsi, l'objectif principal de cette partie de mes travaux est d'identifier les composantes minimales responsables de la multimérisation de CD4 et d'en définir les impacts fonctionnels lors de l'infection par le VIH-1.

Ainsi, les 3 principaux objectifs des travaux de ma thèse sont i) comprendre le rôle de la dégradation du récepteur CD4 médiée par Vpu dans le cycle de réplication du VIH-1, ii) étudier le rôle de Vpu dans la morphogenèse virale et son importance dans le processus de relâche facilitée des particules virales et finalement, iii) étudier le rôle de la dimérisation du récepteur CD4 dans l'infection du VIH-1.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

1. Biologie cellulaire

1.1 Culture cellulaire

Les cellules utilisées proviennent soit de American Type Culture Collection (293T, Jurkat, COS-7) ou du NIH AIDS Research and Reference Program (Hela-CD4-LTR- β -gal, MT4, 1G5, A2.01). Les cellules adhérentes sont cultivées dans du milieu Dullbecco's Eagle modifié (DMEM) et les cellules en suspension sont cultivées dans du RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA). Ces milieux sont complétés par l'ajout de 10% de sérum de fœtus de veau (SFV) et 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Toutes les cellules sont incubées à 37 °C sous une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Les solutions ayant servis à la culture cellulaire, aux transfections et aux infections sont stérilisées soit par filtration sur une membrane de 0,2 micron ou par autoclavage. Les cellules sont congelées dans l'azote liquide dans du milieu (RPMI ou DMEM) contenant 20% SFV, 10% DMSO et 1% d'antibiotiques.

1.1.1 Lignées cellulaires adhérentes

Les cellules 293T sont des cellules fibroblastiques de rein humain ayant été transformées par l'antigène grand T du virus SV40 et la protéine E1a de l'adénovirus de type 5 (138, 215). La présence de l'antigène grand T dans ces cellules favorise la réplication des plasmides possédant l'origine de réplication de SV40 ce qui, par conséquent, permet d'atteindre de très haut niveaux d'expression des protéines d'intérêt.

Les cellules COS-7 sont des cellules dérivées de la lignée cellulaire simienne CV-1 ayant été transformées par un virus SV40 possédant une origine de réplication défective mais codant pour l'antigène grand T (200).

Les cellules Hela-CD4-LTR- β -gal (271) ont été générées à partir des cellules Hela qui sont des cellules épithéliales provenant d'un carcinome cervical humain (37, 260). Cette lignée cellulaire exprime la molécule CD4 et contient une copie intégrée du gène de la β -galactosidase sous contrôle du LTR du VIH-1. Ces cellules seront

utilisées principalement afin de mesurer l'infectivité des virus produits dans différents types cellulaires.

1.1.2 Lignées cellulaires en suspension

Les cellules MT4 sont des cellules de type lymphocytaire exprimant la molécule CD4. Il s'agit d'une lignée cellulaire transformée par HTLV-1 (human T cell leukemia virus type 1) (227).

Les lignées cellulaires Jurkat (Jurkat CD4⁺, Jurkat low-CD4 et Jurkat high-CD4) sont également des lignées de type lymphocytaire. Toutefois, les niveaux de CD4 exprimés à leur surface varient ; les Jurkat CD4⁺ n'expriment pas CD4. Les cellules Jurkat CD4⁺ et les cellules Jurkat high-CD4 sont cultivées dans du RPMI+10% SFV contenant respectivement, de la généticine (500µg/ml) ou de la généticine (500µg/ml) et de la zéocine (50µg/ml) (Invitrogen), tel que décrit dans une publication de Cortes *et al.* (104).

La lignée cellulaire CD4⁺ 1G5 est dérivée des cellules Jurkat T et exprime le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du LTR du VIH-1 (LTR) (4). Ces cellules seront utilisées principalement afin de mesurer l'infectivité des virus produits par transfection et récoltés dans les surnageants de culture.

Les cellules A2.01 sont des cellules lymphocytaires humaines n'exprimant pas la molécule CD4. Ces cellules ont été obtenus par dilution limites de la lignée A3.01 dérivée de la lignée T CEM (166). La lignée MA15 qui exprime la molécule CD4 de type sauvage ainsi que les lignées exprimant les mutants de CD4 (K318E, N358R et Q344E) ont été générées par transfection stable de la lignée A2.01, tel que décrit (358). Ces lignées ont été obtenues du laboratoire du Dr R.P. Sékaly de l'Université de Montréal.

1.1.3 Cellules primaires

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) ont été isolées de volontaires sains par centrifugation sur gradient de Ficoll-Paque tel que recommandé par le manufacturier (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec) et lavées avec du PBS afin de bien éliminer les plaquettes. Ensuite, dans le but d'activer les

lymphocytes, les cellules ont été mises en culture en présence de phytohémagglutinine (PHA, 5µg/ml) pour une période de 72 heures. Suite à cette activation, les cellules ont été lavées avec du milieu complet afin d'éliminer les lectines résiduelles pour ensuite être cultivées dans du milieu RPMI+10%SFV additionné de 20 U/ml d'interleukine-2 (rIL-2; Roche Applied Science, Laval, Québec).

1.2 Transfections

1.2.1 Précipité de phosphate de calcium

La méthode de transfection par précipité de phosphate de calcium a été décrite par Chen *et al.* (83) et est utilisée pour les cellules adhérentes. Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules sont comptées et un ou cinq millions de cellules sont respectivementensemencées dans des pétris de 100mm ou de 150mm de diamètre. Pour les études de microscopie électronique, 2×10^4 cellules sontensemencées sur des lamelles de verre de 1 cm de diamètre. Généralement, entre 0,5 et 20 µg d'ADN total sont transfectés selon les expériences. Les cellules ou les surnageants de culture sont récoltées 48 heures post-transfection.

1.2.2 DEAE-dextran

Les lignées lymphocytaires sont transfectées par la méthode de DEAE-dextran (319). Les cellules sont centrifugées à 800rpm pendant 5 minutes (rotor Heraeus 6445, centrifugeuse Sorvall Legend T, Mandel Scientifics Canada Inc., Guelph, Ontario) et lavées avec du milieu DMEM sans sérum puis resuspendues à une densité de 10^6 cellules/ml dans du milieu DMEM sans sérum. Dix millions de cellules, soit 1 ml de la suspension, est alors ajouté à 2 ml d'une solution contenant 10µg de l'ADN proviral à transfecter et 150µl de DEAE-dextran stérile (5mg/ml dans du Tris 1M à pH 7,4). Les cellules sont alors incubées pendant 1 heure à 37°C dans un incubateur à CO₂. Suite à cette incubation, les cellules sont lavées une première fois dans du milieu DMEM complet pour être finalement resuspendues dans

10ml de milieu RPMI complet. Les surnageants des cellules sont récoltés à l'apparition des syncytia soit environ 48 heures après la transfection.

1.3 Analyse de cytométrie en flux

Marquage de surface de la cellule. Les lignées Jurkat T ou les cellules 293T transfectées ont été lavées et récoltées dans du PBS contenant 5% SFV et incubées dans du PBS 5% SFV avec l'anticorps monoclonal anti-CD4 OKT4. Après 30 minutes à 4 °C, les cellules ont été lavées 2 fois pour ensuite être incubées dans du PBS 5% SFV pour une période de 30 minutes supplémentaires à 4°C avec l'anticorps secondaire, un anti-souris conjugué à la fluorescéine-isothiocyanate (FITC) (BD Biosciences, Mississauga, Ontario). Les cellules ont ensuite été lavées et analysées par cytométrie en flux sur un appareil FACSCalibur® cytometer (BD Biosciences). Comme témoin négatif, des cellules ont seulement été marquées avec l'anti-souris conjugué au FITC.

1.4 Microscopie électronique par balayage

Les cellules 293Tensemencées sur des lamelles de verre sont transfectées avec 0,5µg des constructions provirales HxBH10-*vpu*⁺, HxBH10-*vpu*⁻, HxBH10-*vpu*^{52/56}, HxBH10-*vpu*^{lle6}. 48 heures post-transfection, les cellules sont lavées deux fois délicatement avec du PBS afin d'éliminer les protéines de sérum puis fixées pendant une heure à température ambiante avec une solution de 5% de glutaraldéhyde faite dans une solution saline 0,1M (pH 7,2) (28mM NaH₂PO₄, 72mM Na₂HPO₄). Les échantillons sont ensuite traités pour l'observation au microscope électronique : les échantillons sont post-fixés dans une solution de tétroxyde d'osmium 1%, graduellement déshydratés dans l'éthanol puis séchés avec du CO₂ dans un appareil Balzers CPD 030 critical point dryer (Technotrade International, Manchester, NH). Les échantillons sont alors pulvérisés d'or dans un appareil Baltec MED 020 coating system (Technotrade International, Manchester, NH) puis examinés par microscopie à balayage sur un appareil Jeol 6300F (Jeol USA, Peabody, MA) à une puissance variant entre 5 et 15 kV.

2. Génie génétique

Toutes les méthodes utilisées lors des clonages et de l'amplification plasmidique sont tirées de protocoles issus des manuels *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* et *Current Protocols in Molecular Biology* (14, 450).

Généralement, les digestions enzymatiques de l'ADN sont faites à 37°C pendant 1 heure selon les recommandations du manufacturier (New England Biolabs, Beverly, CA). L'ADN digéré est ensuite déposé sur gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium puis visualisé par une exposition aux ultraviolets (349). Les fragments d'ADN ainsi séparés sont récupérés, purifiés puis reliqués dans un vecteur digéré avec les mêmes enzymes de restriction en utilisant la ligase de l'ADN du phage T4 (New England Biolabs). Les constructions obtenues sont alors transformées par choc thermique dans des bactéries compétentes (AG-1) puis sélectionnées par ensemencement sur milieu LB agar contenant de l'ampicilline afin d'isoler un clone. Le criblage des clones positifs est effectué par digestion enzymatique. Les colonies isolées possédant le clone voulu sont alors amplifiées dans un bouillon de culture contenant de l'ampicilline et l'ADN extrait de ces bactéries par la méthode de lyse alcaline. L'ADN est purifié par une centrifugation à l'équilibre sur gradient de chlorure de césium.

3. Plasmides et vecteurs d'expression

3.1 Expresseurs de CD4

Les constructions plasmidiques SVCMV-CD4, SVCMV-CD4^{C4202A} et SVCMV-CD4Δ32 ont été décrites précédemment (29, 517, 561). La construction SVCMV-CD4ΔCDR2 qui exprime un mutant du récepteur CD4 contient une délétion de 7 acides aminés (position à 43-49) dans la région CDR2 du domaine D1 de la molécule. L'expresseur a été généré en sous-clonant dans pGEM-7Zf (Promega, Madison, WI) le fragment *HindIII-BamHI* obtenu de la construction pMNC-CD4ΔCDR2 (165). Ensuite, le fragment *XbaI-BamHI* de l'intermédiaire pGEM-7Zf-CD4ΔCDR2 a été cloné en utilisant les sites *XbaI-BglII* du vecteur d'expression SVCMVexPA afin de générer SVCMV-CD4ΔCDR2.

3.2 Clones moléculaires de VIH-1

Les constructions provirales HxBH10-*vpu*⁺/*vpu*⁻/*vpu*^{52/56}/*vpu*^{lle6} ont été décrites précédemment (174, 516). Le génotype de ces constructions est: 5'LTR-*gag*⁺,*pol*⁺,*vif*⁺,*vpr*⁻,*tat*⁺,*rev*⁺,*vpu*^{+/-},*env*⁺,*nef*⁻-LTR3'. Le clone moléculaire infectieux pNL4.3 a été obtenu du AIDS Research and Reference Reagent Program (2). Ce provirus encode tous les gènes accessoires du virus. La construction provirale pNL4.3-*nef*⁻ a été décrite précédemment (217). Les constructions provirales isogéniques pNL4.3-*vpu*^{+/-}/*nef*^{+/-} ont été obtenues en remplaçant le fragment *Sall*-*Bam*HI (respectivement, nucléotides en position 5 785 et 8 465, +1= site d'initiation de la transcription) des provirus pNL4.3-*nef*^{+/-} par les fragments *Sall*-*Bam*HI correspondants des constructions HxBH10-*vpu*^{+/-}.

3.3 Autres vecteurs d'expression

Le plasmide contrôle utilisé tout au long des expériences est le vecteur d'expression SVCMVexPA. Ce vecteur ainsi que l'expresseur de la glycoprotéine de l'enveloppe G du virus de la stomatite vésiculaire (SVCMV-VSV-G) a été décrit précédemment (564). L'expresseur de la tyrosine kinase p56^{lck} (SVCMV- p56^{lck}) a été généré en sous-clonant le fragment *Sac*I de la construction pGEMEX-1-hp56^{lck} (obtenu du laboratoire du Dr R.P. Sékaly, Université de Montréal) en utilisant le même site du vecteur d'expression SVCMVexPA. La construction a été réalisée par le Dr Xiao-Jian Yao.

4. Virologie

4.1 Productions virales

Les virus HxBH10-*vpu*⁺/*vpu*⁻, pNL4.3 et les virus pseudotypés avec VSV-G ont été produits en transfectant 5x10⁶ cellules 293T avec 5µg d'ADN des constructions provirales ou, dans le cas des virus pseudotypés, avec 10µg d'ADN des constructions provirales et 10µg de l'ADN de l'expresseur SVCMV-VSV-G par la méthode du calcium-phosphate (564). 48 heures post-transfection, les virus relâchés dans les surnageants et/ou les virus associés à la cellule sont récoltés.

Afin de récupérer les virus qui sont toujours associés à la membrane cellulaire, les cellules sont récupérées puis resuspendues dans 10 ml de milieu DMEM. Les particules virales associées aux cellules 293T transfectées sont détachées par une série de trois vortex (Maxi Mix II 37 600; VWR International Ltd., Montréal, Québec) d'une durée de 5 secondes à intensité moyenne. Dans ces conditions, la mortalité cellulaire est réduite au minimum tel que déterminé par un compte cellulaire au bleu de trypan. Les surnageants contenant les particules virales détachées de la cellule sont clarifiés. La densité des particules virales associées à la cellule et des particules virales relâchées est déterminée par centrifugation à l'équilibre sur gradient de sucrose et l'infectivité, mesurée par essai MAGI.

4.1.1 Coussin de sucrose

Quarante-huit heures post-transfection, les surnageants des cellules 293T transfectées sont récoltés, clarifiés par centrifugation à 3 000 rpm pendant 30 minutes et filtrés sur une membrane de 0,45 µm. Ensuite, les virus sont concentrés par ultracentrifugation pendant 2 heures à 4°C sur un coussin de 20% sucrose à 45 000 rpm dans un rotor de type 70Ti rotor (Beckman instruments, Mississauga, Ontario). La production virale est évaluée en mesurant l'activité de transcriptase inverse par un essai standard (RT) dans une réaction de 50µl tel que décrit. Les virus utilisés pour les infections sont resuspendus dans du milieu DMEM 20% SFV et les virus qui serviront à l'analyse des protéines associées à la particule virale sont resuspendus dans du tampon de lyse.

4.1.2 Gradient de sucrose

Quarante-huit heures post-transfection, les virus relâchés dans les surnageants et les virus associés à la cellule sont récoltés et concentrés sur coussin de sucrose tel que décrit dans la section 4.1.1. Les virus concentrés sont resuspendus dans 800µl de DMEM. La production virale est évaluée en mesurant l'activité de transcriptase inverse par un essai RT. Des quantités similaires de virus sont alors déposées sur un gradient de sucrose constitué de 14 fractions de PBS-sucrose dont les concentrations s'échelonnent de 20 à 60% [poids/volume]. Suite à une centrifugation de 17 heures à

35 000 rpm dans un rotor de type SW41Ti (Beckman instruments), 14 fractions de 800µl sont récupérées puis analysées par essai de RT et immunobuvardage contre la p24 afin de déterminer la densité des particules virales. La densité de chacune des fractions est évaluée en duplicata à l'aide d'un réfractomètre (Bausch & Lomb ; Fischer Scientific Co., Montréal, Québec).

4.2 Essai de reverse transcriptase

Les essais de reverse transcriptase sont effectués sur 50µl de surnageants viraux clarifiés. Ces surnageants sont ajoutés à 50µl d'un mélange réactionnel contenant des détergents, des ions, une matrice ainsi que de la thymidine tritiée ($[^3\text{H}]$ -déoxythymidine 5'-triphosphate) (ICN radiochemicals, Irvine, CA). Le cocktail de reverse transcriptase contient : 50mM Tris (pH7,9), 5mM MgCl_2 , 150mM KCl, 0,5mM EGTA, 0,05% Triton X-100, 2% éthylène glycol, 5mM dithiothréol (DTT), 3mM glutathione réduit (GSH), 50µg/ml de poly(rA)-Oligo(dT) et 20µCi de $[^3\text{H}]$ -dTTP. Après une incubation de 22 heures à 33 °C, les acides nucléiques sont précipités pendant 2 heures sur la glace avec 1ml d'acide trichloroacétique (TCA) 10% froid. L'ADN double-brin ayant incorporé la thymidine tritiée est récupéré par filtration. Les filtres sont lavés 2 fois avec du TCA 5% puis finalement avec de l'éthanol 100%. Les filtres sont séchés puis déposés dans des vials contenant du liquide à scintillation afin que la radioactivité incorporée puisse être mesurée à l'aide d'un compteur Beta (Beckman LS 6000SC ; Beckman instruments).

4.3 Étude de réplication virale et infections

Les cellules MT4 (10^6) ou les PBMCs (3×10^6) ont été infectées avec une quantité équivalente de virus (HxBH10- vpu^+/vpu^-) telle que déterminée par la mesure de l'activité RT (MT4: 2×10^5 cpm de RT; PBMC: 7.5×10^6 cpm de RT). Les lignées cellulaires A2.01 exprimant de manière stable les mutants de dimérisation de CD4 (K318E, N358R et Q344E) (3×10^6) ont été infectées avec des quantités similaires (3×10^6 cpm de RT) de virus pNL4.3. Suivant une période d'adsorption de 4h, les cellules ont été lavées avec du PBS et resuspendues dans 10ml de RPMI+10% SFV. À des intervalles de temps réguliers, les cellules sont récoltées par centrifugation et

réensemencées dans du milieu frais à une concentration variant entre 10^6 et 5×10^5 de cellules viables par ml. Les surnageants des cellules récoltées sont analysées pour la présence de virus en effectuant un essai de RT tel que décrit précédemment (174).

Les lignées cellulaires T Jurkat ($CD4^-$, low-CD4 ou high-CD4) (3×10^6) ont été infectées avec des quantités similaires de virus HxBH10-*vpu*⁺/*vpu*⁻ pseudotypés avec VSV-G (3×10^7 cpm of RT). Suivant une période d'adsorption de 4h, les cellules ont été lavées avec du PBS et resuspendues dans 10ml de RPMI+10%SFV. L'infectivité des virions relâchés dans le surnageant est analysée 48h post-infection.

4.4 Essais d'infectivité

Pour les essais d'infectivité, les cellules 293T (10^6) ont été soit transfectées avec un contrôle négatif (Mock), soit transfectées avec 5µg d'ADN proviral (HXBH10-*vpu*⁺, HXBH10-*vpu*⁻, HXBH10-*vpu*^{52/56}) et/ou co-transfectées avec 5µg des expresseurs de CD4 (SVCMV-CD4, SVCMV-CD4Δ32 ou CD4-ΔCDR2). La concentration des ADN transfectés est normalisée dans chaque échantillon par l'ajout du plasmide contrôle SVCMVexPA. Les préparations virales de pNL4.3-*vpu*^{+/+}/*nef*^{+/+} sont obtenues en transfectant 10µg des ADN proviraux correspondant dans 2×10^6 cellules MT4 par la méthode du DEAE-dextran. Les surnageants des cultures sont récoltés entre 48-72 après la transfection. L'infectivité des virus présents dans les surnageants clarifiés et/ou associés à la cellule a été mesurée par un essai appelé « multinuclear activation of β-gal infectivity assay » (essai MAGI) (271) ou encore par un essai d'activité luciférase (4).

4.4.1 Essai MAGI

Brièvement, dans le cas de l'essai MAGI, des quantités équivalentes de virus (de 6×10^5 à 6×10^6 cpm de RT) ont été utilisées pour infecter les cellules Hela-CD4-LTR-β-gal qui avaient été ensemencées le jour précédent dans des plaques de 24 puits (3×10^4 cellules par puit). Dans certains cas, pour augmenter l'efficacité d'infection, on utilise la spinoculation (376): pendant la durée de l'infection (2 heures à 25°C), les cellules sont centrifugées à 2 000 rpm (Sorvall Legend T) ce qui permet aux virus de s'adsorber plus efficacement sur la monocouche cellulaire. 48 heures

après l'infection, les cellules sont lavées, fixées et colorées au X-Gal tel que décrit (271). Le nombre de cellules bleues β -gal positives a été déterminé par comptage au microscope photonique. Chaque échantillon est analysé en duplicata.

4.4.2 Essai luciférase

Pour l'essai luciférase, des quantités équivalentes de virus ($1-5 \times 10^6$ cpm de RT) ont été utilisées pour infecter 2×10^5 cellules 1G5 (la lignée indicatrice LTR-luciférase). Immédiatement après l'adsorption, les cellules sont lavées et mises en présence de quantité neutralisante des anticorps anti-CD4 et anti-gp120 afin de prévenir la formation de syncytia. Pour les expériences de transmission du virus de cellules à cellules, on ajoute des quantités croissantes de ces anticorps neutralisants. 24 heures post-infection, de l'AZT a été ajouté à une concentration finale de $10 \mu\text{M}$ dans le but de limiter l'infection à un seul cycle de réplication. 48 heures post-infection, les cellules sont récoltées puis lysées et l'essai luciférase est effectué en suivant les recommandations du manufacturier (Promega).

5. Analyse des protéines

5.1 Anticorps

Les anticorps monoclonaux anti-CD4 (OKT4) et anti-p24 sont obtenus à partir des fluides ascitiques de souris Balb/c injectées avec les hybridomes OKT4 ou p24 (respectivement, American Type Culture Collection, catalog #ATCC CRL-8002 et #ATCC HB9725. Rockville, MD). Les anticorps polyclonaux de lapin anti-CD4 H-370 ont été achetés chez Santa Cruz biotechnology (catalog #sc-7219). Le sérum anti-VIH-1(162) a été obtenu d'un patient infecté par le VIH-1 et testé positif pour la présence d'anticorps dirigés contre le VIH-1 par ELISA. Finalement, les anticorps monoclonaux anti-gp41 ont été obtenus en récoltant les surnageants des hybridomes Chessie 8 en culture (1). Les anticorps monoclonaux de souris anti-gp120 (1D6) (129) et les hybridomes Chessie 8 produisant des anticorps dirigés contre la gp41 ont été obtenus du AIDS research and reference reagent program.

5.2 Marquage métabolique des cellules

Quarante-huit heures après la transfection des cellules COS-7 avec les vecteurs d'expression eucaryotes SVCMV-CD4 ou SVCMV-CD4^{C4202A} en présence ou en absence de SVCMV-p56^{lck}, les cellules sont récoltées puis cultivées pendant 30 minutes à 37°C dans un incubateur à CO₂ dans du milieu DMEM dépourvu de méthionine et de cystéine (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA). Les cellules sont ensuite lavées puis resuspendues et incubées dans le milieu de carence contenant un cocktail d'acides aminés radioactifs (200 µCi) dont la [³⁵S]méthionine et la [³⁵S]cystéine (ICN Pharmaceuticals). Après 5 heures d'incubation, les cellules sont récoltées puis resuspendues dans un tampon de lyse fait de 0.5% digitonine (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), 150 mM NaCl, 20 mM triéthanolamine, et 1mM EDTA. Les échantillons sont ensuite congelés à -20°C pour être ensuite immunoprécipités.

5.3 Immunoprécipitation

5.3.1 Analyse des protéines associées à la particule virale

Les surnageants provenant des cellules MT4 transfectées par un provirus exprimant le VIH ou provenant des cellules 293T co-transfectées avec un expresseur de CD4 et un provirus exprimant le VIH ont été récoltés et clarifiés par une centrifugation à 3 000 rpm. À partir de ces surnageants dépourvus de débris cellulaires, les virions ont été concentrés par une centrifugation sur un gradient de sucrose 20% tel que précédemment décrit dans la section Productions virales. Des quantités équivalentes de virus, normalisées par une mesure de l'activité RT, ont été lysées dans du tampon RIPA (140 mM NaCl, 8mM Na₂HPO₄, 2mM NaH₂PO₄, 1,2 mM sel de sodium d'acide déoxycholique, 0,5% SDS et 1% NP-40), divisées en deux fractions équivalentes puis immunoprécipitées soit en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre CD4 (OKT4) ou un sérum anti-VIH-1 (patient #162). Les complexes immuns ont été immunoprécipités en utilisant des billes de protéine A-sépharose (Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Québec), lavés, resuspendus dans un tampon réducteur, bouillis puis séparés par électrophorèse sur un gel de 8% ou 12,5%

de SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE) pour être finalement analysés par immunobuvardage.

5.3.2 Analyse biochimique de la formation de dimères de CD4

Les cellules lysées dans la digitonine sont centrifugées à 13 000 rpm (Sorvall Biofuge *pico*) afin d'éliminer les membranes cellulaires. Les surnageants sont récoltés puis, afin de diminuer les signaux non-spécifiques, les lysats sont pré-adsorbés avec des anticorps provenant de sérum de souris normal pour être ensuite immunoprécipités en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre CD4 (OKT4). Les complexes immuns ont été immunoprécipités en utilisant des billes de protéine A-sépharose (Pharmacia Biotech), lavés et resuspendus dans un tampon Laemli (60 mM Tris (pH 6.8), 20 µg/ml bleu de bromophénol et 6% glycérol) non-réducteur et non-dénaturant *i.e.* ne contenant pas de sodium dodécyl-sulfate (SDS) ni de 2-β-mercaptoéthanol (2-ME). Les complexes immuns sont séparés par électrophorèse sur un gel de 8% SDS-PAGE sans être bouillis. En effet, afin de dissocier les complexes immuns des billes de sépharose, les échantillons sont incubés à 37 °C pendant 5 minutes. Les gels sont fixés (méthanol et acide acétique glacial), séchés puis exposés sur autoradiogramme (Eastman Kodak, Rochester, NY). De manière alternative, des échantillons provenant de cellules non-radiomarquées sont préparés de la même manière puis analysés par immunobuvardage.

5.4 Immunobuvardage

Suite à l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (taille des pores de 0,45µM; Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario) par électrotransfert pendant 3h à 30V sur un appareil Bio-Rad Trans Blot Cell dans un tampon de transfert (25mM Tris, 193mM glycine, 20% méthanol) pour l'analyse des protéines associées aux virions. De manière alternative, les protéines sont transférées par électrotransfert pendant 17h à 30V dans un tampon de transfert (25mM Tris, 193mM glycine, 15% méthanol, 0,2% SDS) pour l'analyse de la formation des dimères de CD4.

Les membranes récupérées sont alors incubées dans un tampon de blocage pendant 1h (Tampon salin Tris (TBS) contenant 1% de Tween-20 et 5% de lait en poudre écrémé) suivie d'une incubation de 2h avec soit des anticorps polyclonaux dirigés contre CD4 (dilution de 1/500) ou des anticorps monoclonaux dirigés contre la gp120 (dilution de 1/1 000) ou la p24 (dilution de 1/4 000). Les anticorps liés ont été sondés en utilisant des anticorps anti- souris ou anti-lapin liés à la peroxidase de rainfort (dilution de 1/7 500). Les membranes ont été lavées soigneusement puis révélées par une méthode sensible de détection par chemiluminescence (ECL detection kit; Amersham Biosciences). Pour la détection des niveaux de gp41 associés au virus, des dilutions sériées de virus ont été séparées directement par SDS-PAGE puis analysées par immunobuvardage, tel que décrit, en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre la gp41 (surnageant non-dilué d'hybridomes).

Chapitre 3

Étude du rôle de la dégradation du récepteur CD4 médiée par Vpu dans le cycle de réplication du VIH-1

1. Préambule

Lors de l'infection par le VIH-1, plusieurs protéines virales, dont Vpu, entraînent une diminution importante de l'expression de surface du récepteur viral CD4 (109, 144). De récentes études ont permis de mettre en évidence que la diminution de l'expression de CD4 médiée par Vpu et/ou Nef joue un rôle dans la réplication virale permettant de croire que l'expression de CD4 pourrait être un important régulateur de la pathogénèse associée au VIH-1 (41, 104, 291, 437). Dans la première partie des travaux de ma thèse, nous avons pu démontrer que la dégradation de CD4 médiée par Vpu contribue à l'infectivité virale en réduisant l'expression de surface de la molécule CD4 ainsi que son incorporation dans les particules virales. En effet, en absence de Vpu, une quantité significative de CD4 se retrouve à la surface cellulaire et dans les virions entraînant ainsi la formation de complexes de haute affinité entre la glycoprotéine gp120 du virus et CD4 ce qui a pour effet de diminuer drastiquement l'infectivité virale. Par ailleurs, nous avons également démontré que la perte d'infectivité associée à l'incorporation de CD4 est directement reliée à son interaction avec gp120 plutôt qu'à un changement morphologique du virion vu que l'incorporation en *trans* de la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) permet de rétablir le potentiel infectieux des virions. Ainsi, nos résultats suggèrent fortement que Vpu contribue à l'infection et à la pathogénèse du VIH-1 en optimisant la relâche et l'infectivité des particules virales.

Les résultats présentés dans cette section ont fait l'objet d'une publication dans Journal of Biological Chemistry inclus à l'annexe 1 du présent manuscrit. Avec la collaboration de Dr Zhao qui a contribué à toute la mise en place du projet, j'ai pu participer à la genèse des résultats de cet article, à l'exception des résultats de la figure 5. Par ailleurs, j'ai également contribué à l'écriture de cet article avec l'aide et la supervision de mon directeur de thèse, le Dr Éric A. Cohen.

Levesque, K., Zhao, Y.S., Cohen, E.A. 2003. Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells. J. Biol. Chem. **278**:28346-53.

2. Résultats

2.1 La dégradation du récepteur CD4 médiée par Vpu permet de rétablir l'effet négatif de l'expression de CD4 à la surface de la cellule sur l'infectivité virale

Il a déjà été démontré que la diminution de l'expression de surface de CD4 médiée par Nef constituait un important régulateur du cycle de réplication du VIH-1 (104, 291, 437). Ainsi, dans un premier temps, nous avons voulu étudier l'effet de l'expression de surface de CD4 sur l'infectivité des virus produits dans les cellules 293T et ce, à partir de virus isogéniques sauf pour l'expression de Vpu. Les virus isogéniques HxBH10-*vpu*⁺ ou HxBH10-*vpu*⁻ ont été produits dans les cellules 293T suite à une cotransfection de l'ADN proviral et de concentrations croissantes de SVCMV-CD4. Les constructions provirales proviennent de HxBc2 et, par conséquent, possèdent un codon stop prématuré dans Nef (421). 48 heures post-transfection, les cellules et les surnageants de culture ont été récoltés afin de mesurer les niveaux d'expression de surface de CD4 et d'évaluer le potentiel infectieux des particules virales relâchées. Tel que précédemment décrit, les analyses de FACS démontrent que l'expression de Vpu entraîne une réduction significative de l'expression de surface de CD4 à la surface de la cellule (Fig. 1A) (546). L'infectivité des virus produits dans les cultures Vpu⁺ et Vpu⁻ a ensuite été évaluée par un essai MAGI en utilisant des quantités similaires de virus telles que déterminées selon l'activité transcriptase inverse. Les résultats de la figure 1B démontrent clairement que l'expression de quantité croissante de CD4 entraîne une diminution importante de l'infectivité virale qui est directement proportionnelle au niveau d'expression de CD4 à la surface de la cellule. De façon intéressante, l'effet négatif de CD4 sur l'infectivité virale est davantage important (2 à 7 fois) avec des virus défectifs pour l'expression de Vpu que pour des virus Vpu⁺. Cependant, le potentiel infectieux des virus Vpu⁺ ou Vpu⁻ est comparable lorsque les virus sont produits dans des cellules 293T CD4⁺ (Fig. 1 C-D). Afin de reconfirmer les résultats obtenus avec l'essai MAGI, nous avons également testé l'infectivité des virus Vpu⁺ ou Vpu⁻ produits dans

des cellules transfectées avec ou sans CD4 en utilisant les cellules indicatrices (luciférase) 1G5 qui sont une lignée T CD4⁺. Tel que montré à la figure 1C, le potentiel infectieux des virus Vpu⁺ et Vpu⁻ est identique lorsque les virus sont produits en absence de CD4 tandis qu'il diffère significativement lorsque les virus sont produits en présence de CD4. Le cas échéant, les virus défectifs pour Vpu possèdent un potentiel infectieux d'environ 4 fois moindre que les virus Vpu⁺. Par ailleurs, ces résultats ont été confirmés par des expériences similaires réalisées en utilisant des lignées de cellules T Jurkat exprimant différents niveaux de CD4 à leur surface (Fig. 1E). Les résultats présentés à la figure 1F réaffirment clairement que Vpu atténue l'effet négatif de l'expression de CD4 à la surface de la cellule sur l'infectivité des virus produits dans les lignées T Jurkat exprimant différents niveaux de CD4 à leur surface.

Afin de déterminer si la dégradation de CD4 médiée par Vpu est directement responsable de la modulation positive de l'infectivité du VIH-1 par Vpu dans les cellules exprimant CD4, nous avons utilisé un mutant de Vpu et un mutant de CD4 dont les phénotypes sont associés à une perte de l'induction de la dégradation de CD4 induite par Vpu. Le provirus HxBH10-*vpu*^{52/56} encode une protéine mutante de Vpu qui possède des mutations de substitution à ses deux résidus Ser-52 et Ser-56 qui sont les sites de phosphorylation de la protéine. Ce mutant de Vpu est incapable de médier l'initiation de la protéolyse de CD4 (174). CD4Δ32 est un mutant de délétion de la queue cytoplasmique de CD4 qui est exprimé à la surface de la cellule mais qui n'est pas susceptible à la dégradation induite par Vpu puisque le site d'attachement de Vpu y est absent (561). Les provirus HxBH10-*vpu*⁺, HxBH10-*vpu*⁻ ou HxBH10-*vpu*^{52/56} ont été cotransfectés avec les plasmides SVCMV-CD4, SVCMV-CD4Δ32 ou le plasmide contrôle dans les cellules 293T. Quarante-huit heures post-transfection, les virus produits ont été récoltés puis, tel que décrit dans la section Matériel et méthodes, un essai MAGI a été réalisé. La figure 1D montre que les particules du VIH-1 qui sont Vpu⁻, Vpu⁺ ou Vpu^{52/56} possèdent un potentiel infectieux similaire lorsque produites dans des cellules n'exprimant pas CD4. De manière intéressante, en présence de la molécule CD4 de type sauvage, le nombre de cellules β-gal positives obtenues suite à l'infection avec un virus exprimant le mutant Vpu^{52/56} est réduit de

manière considérable lorsque comparé avec les virus Vpu⁺. En fait, l'infectivité des virus Vpu^{52/56} est comparable à ce qui est obtenu avec les virus Vpu⁻. De plus, les virus Vpu⁺ et Vpu⁻ produits dans les 293T exprimant la molécule CD4Δ32 démontrent une baisse drastique de leur potentiel infectieux (Fig. 1D). Conséquemment, ces résultats supportent davantage l'importance d'induire une diminution du niveau d'expression de CD4 afin d'obtenir des particules virales pleinement infectieuses dans les cellules exprimant CD4. Dans l'ensemble, ces résultats confirment que l'expression de CD4 à la surface de la cellule entraîne un effet néfaste sur le potentiel infectieux des particules virales du VIH-1 et montre que Vpu, en induisant la dégradation de CD4 contrecarre cette perte d'infectivité liée à l'expression de CD4 à la surface de la cellule.

2.2 Vpu module positivement l'infectivité des particules virales du VIH-1 produites dans les lignées de cellules T et les PBMCs

Afin d'examiner si Vpu peut moduler l'infectivité des particules virales du VIH-1 relâchées à partir de cellules exprimant des niveaux physiologiques de CD4 à leur surface, nous avons analysé le potentiel infectieux de virus isogéniques Vpu⁺ et Vpu⁻ produits suite à une infection de la lignée lymphocytaire CD4⁺ MT4 et des PBMCs isolés à partir de deux donneurs indépendants. Les virus utilisés pour effectuer les études de cinétique de réplication virale dans les MT4 et les PBMCs ont été produits dans les cellules 293T transfectées avec HxBH10-*vpu*⁺ ou HxBH10-*vpu*⁻. Tel que démontré précédemment, les cellules MT4 et les PBMCs infectés avec des virus du VIH-1 exprimant Vpu relâchent de 2 à 8 fois plus de particules virales à l'apogée de la cinétique de réplication que les cellules infectées avec un virus Vpu⁻ (Fig. 2, panneaux A-C) (462).

À différents intervalles de temps pendant la cinétique de réplication virale, des surnageants clarifiés ont été récoltés dans chaque culture puis leur potentiel infectieux déterminé par une essai MAGI en utilisant des quantités similaires de virus tel que mesuré par l'activité RT. De manière constante, nous observons une diminution importante de l'infectivité virale des virus n'exprimant pas Vpu

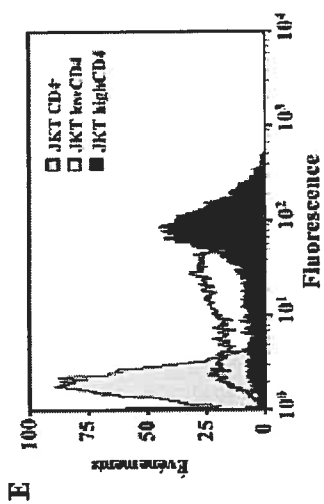
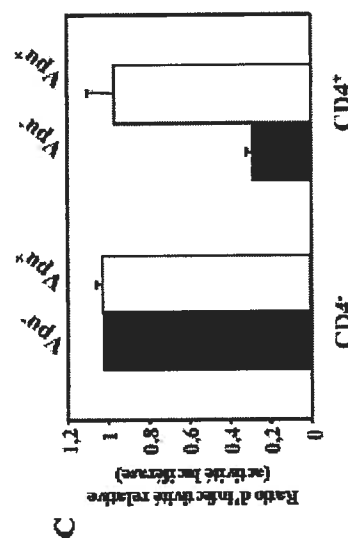
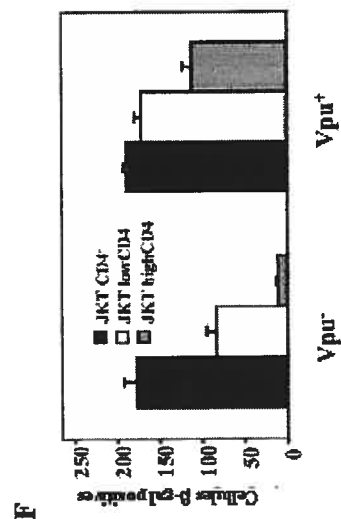
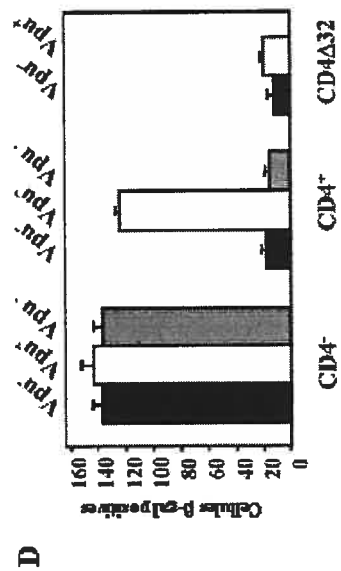
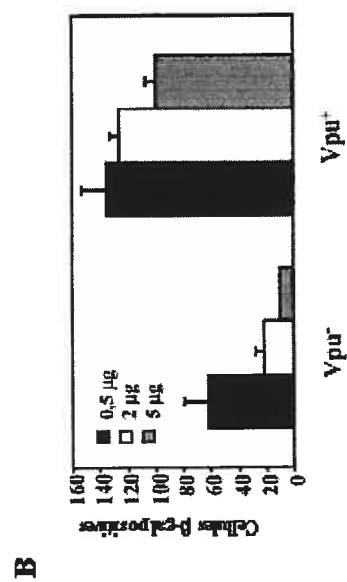
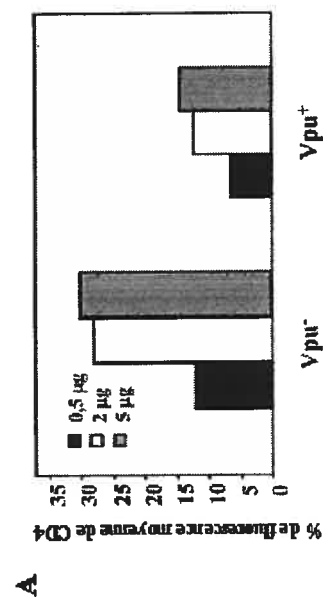
Figure 1. La diminution de l'expression de surface de CD4 induite par Vpu exerce un effet positif sur l'infectivité du VIH-1.

A-B. Effet de Vpu sur l'infectivité du VIH-1 dans les cellules 293T exprimant CD4. Les cellules 293T ont été cotransfectées avec les constructions provirales HxBH10-*vpu*⁺ (Vpu⁺) ou HxBH10-*vpu*⁻ (Vpu⁻) et des quantités croissantes de SVCMV-CD4 (CD4⁺). Les cellules et les surnageants de cultures ont été récoltés 48h post-transfection. (A) Les cellules 293T transfectées ont été colorées avec des anticorps monoclonaux dirigés contre CD4 (OKT4) et le niveau d'expression de surface de CD4 a été mesuré par analyse de FACS (B) L'infectivité des virus produits dans chaque culture a été déterminée par essai MAGI. Les cellules Hela-CD4-β-gal ont été infectées avec des quantités similaires de virus tel que déterminé par l'activité RT (4x10⁵ cpm de RT). 48 heures post-infection, les cellules infectées sont fixées et colorées avec du X-Gal. Le nombre de cellules infectées par le VIH-1 a été déterminé en comptant le nombre de cellules bleues β-gal positives. Les résultats sont représentatifs des résultats obtenus dans au moins 2 expériences indépendantes.

C. Essai d'infectivité utilisant la luciférase. L'infectivité des virus produits tel que décrit précédemment a été déterminée en infectant les cellules de la lignée T indicatrice 1G5-luciférase. Les résultats sont représentés sous forme de ratio relatif où l'infectivité des virus Vpu⁺ prend de manière arbitraire la valeur 1. Les résultats sont représentatifs des résultats obtenus dans au moins 4 expériences indépendantes.

D. La dégradation de CD4 induite par Vpu module positivement l'infectivité du VIH-1. Les provirus HxBH10-*vpu*⁺ (Vpu⁺), HxBH10-*vpu*⁻ (Vpu⁻) ou HxBH10-*vpu*^{52/56} (Vpu^{52/56}) ont été cotransfectés dans les cellules 293T avec SVCMV-CD4wt (CD4⁺), SVCMV-CD4Δ32 (CD4Δ32) ou le plasmide contrôle (CD4⁻). 48 heures post-transfection, les surnageants des cellules sont récoltés et la production virale évaluée par un essai RT. L'infectivité des virus produits dans chaque culture a été déterminée par essai MAGI. Les résultats sont représentatifs des résultats obtenus dans au moins 3 expériences indépendantes.

E-F. Effet de Vpu sur l'infectivité du VIH-1 dans les cellules T Jurkat exprimant différents niveaux de CD4 à leur surface. (E) Des cellules T Jurkat non-infectées (CD4⁻, low-CD4 or high-CD4) ont été colorées avec des anticorps monoclonaux dirigés contre CD4 (OKT4) et le niveau de CD4 exprimé à surface de la cellule déterminé par analyse de FACS. (F) Les cellules T Jurkat ont été infectées par des virus HxBH10-*vpu*⁺ ou HxBH10-*vpu*⁻ pseudotypés avec VSV-G. 48 heures post-infection, les surnageants des cellules sont récoltés et l'infectivité des virus produits dans chaque culture a été déterminée par essai MAGI. Les résultats sont représentatifs des résultats obtenus dans au moins 2 expériences indépendantes.



comparativement aux virus homologues isogéniques Vpu⁺ et ce, qu'ils soient produits dans les lignées T CD4⁺ MT4 (Fig. 2D) ou les Jurkat (Fig. 1F) ainsi que dans les PBMCs (Fig. 2E et F). Cette perte d'infectivité liée à une absence de l'expression de Vpu varie approximativement de 2 à 10 fois au maximum de la réplication virale et ce, dépendamment du donneur de PBMCs ou de la lignée T utilisée. À partir de ces résultats, nous concluons que Vpu module positivement l'infectivité des particules virales du VIH-1 produites dans les lignées de cellules T et les cellules primaires PBMCs exprimant des niveaux physiologiques de la molécule CD4.

2.3 L'incorporation de CD4 dans les virions interfère avec le niveau d'enveloppe fonctionnelle associée à la particule virale du VIH-1

Afin de comprendre le mécanisme moléculaire sous-jacent à l'inhibition de l'infectivité virale médiée par l'expression de CD4, nous avons procédé à une analyse détaillée de la composition protéique des particules virales relâchées à partir de cellules 293T exprimant CD4. Ainsi, nous avons voulu déterminer si: i) la molécule CD4 pouvait être incorporée dans la particule virale; ii) si la modulation de l'expression de surface de CD4 médiée par Vpu pouvait influencer le niveau de CD4 et de la glycoprotéine de l'Env incorporé dans la particule virale. Des cellules 293T ont été cotransfectées avec SVCMV-CD4 ou le plasmide contrôle et les constructions provirales HxBH10-*vpu*⁻ ou HxBH10-*vpu*⁺. Quarante-huit heures post-transfection, les surnageants clarifiés sont récoltés soit pour déterminer l'infectivité virale par essai MAGI ou pour concentrer les virions par ultracentrifugation afin d'en analyser la composition protéique. Les virions concentrés sont resuspendus dans du tampon de lyse RIPA et divisés en deux fractions équivalentes qui sont immunoprécipitées avec des anticorps monoclonaux dirigés contre CD4 (OKT4) ou avec un sérum humain reconnaissant les protéines du VIH-1. Les complexes immuns sont séparés sur SDS-PAGE puis transférés sur une membrane de nitrocellulose afin d'effectuer une analyse d'immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre CD4, la gp120 ou la p24. Les résultats de la figure 3A démontrent clairement que les molécules de CD4 peuvent être incorporés à la particule virale lorsque relâchées de cellules 293T exprimant CD4 (Fig. 3A lignes 5-6, CD4 total).

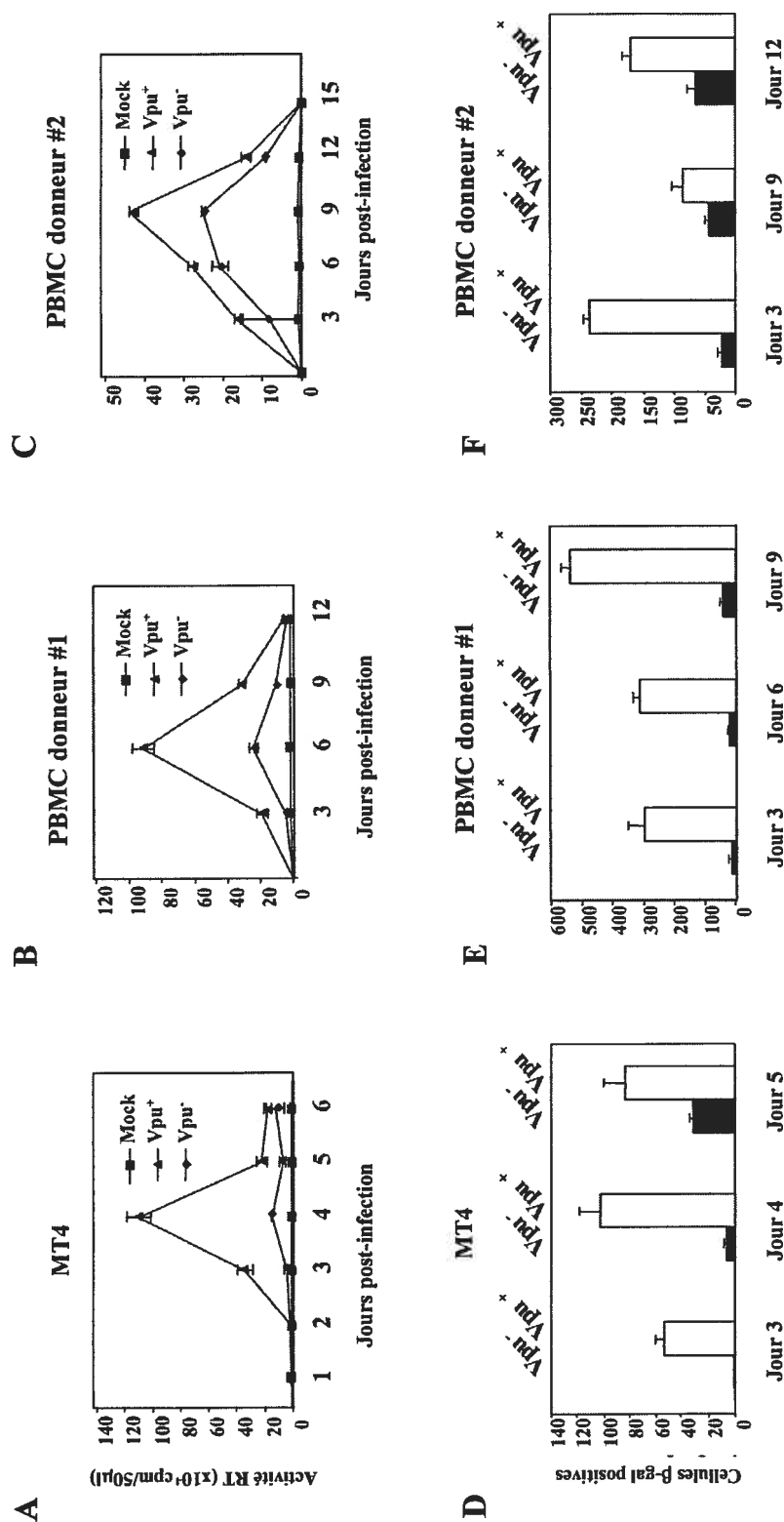


Figure 2. Vpu module positivement l'infectivité des particules virales du VIH-1 produites dans la lignée cellulaire MT4 et les cellules primaires PBMCs.

Les cellules MT4 (A,D) et les PBMC isolées à partir de deux donneurs indépendants (B-C, E-F) ont été infectées avec des quantités équivalentes de virus HxBH10-*vpu*⁺ (▲) ou HxBH10-*vpu*⁻ (●) ou non-infectées (■). À des intervalles de temps réguliers, les surnageants des cultures ont été récoltés. La production virale a été évaluée en duplicata par un essai RT (A-C) et l'infectivité mesurée par essai MAGI (D-F). Les résultats sont représentatifs des résultats obtenus dans au moins 3 expériences indépendantes.

L'absence de détection de CD4 dans les surnageants des cellules 293T exprimant seulement CD4 élimine la possibilité que l'association de CD4 à la particule virale puisse être issue de contaminations dérivées de microvésicules cellulaires (Fig. 3A, ligne 2, CD4 total).

Des quantités significatives de CD4 sont incorporées à la particule virale lorsque Vpu n'est pas exprimée tandis qu'en présence de Vpu, le niveau de CD4 incorporé diminue de façon substantielle (Fig. 3A, comparer les lignes 5 et 6, CD4 total). Des résultats similaires sont obtenus lorsque les virus sont produits dans la lignée cellulaire T CD4⁺ MT4 et que les niveaux de CD4 endogènes incorporés à la particule virale sont analysés. (Fig. 4A, comparer les lignes 2 et 3). De manière intéressante, le recrutement de CD4 dans la particule virale ne semble pas dépendre de l'interaction CD4-gp120 puisque CD4 est quand même incorporé dans les virions lorsque les particules sont produites à partir de cellules produisant des virus défectifs pour l'Env ou encore à partir de cellules exprimant CD4-ΔCDR2, un mutant de CD4 incapable de se lier à la gp120 (Fig. 3C). Par ailleurs, nos résultats montrent qu'il existe une corrélation entre la diminution de l'expression de CD4 induite par Vpu et l'augmentation du potentiel infectieux des particules virales (Fig. 3D, comparer Vpu⁻/CD4⁺ avec Vpu⁺/CD4⁺). De plus, la figure 3D montre que la perte d'infectivité observée en absence de Vpu est essentiellement liée à la capacité de CD4 à s'associer à la gp120. En effet, le mutant CD4ΔCDR2 qui est incapable de se lier à la gp120 (165) n'affecte pas le potentiel infectieux des particules et ce, malgré qu'exprimé à la surface de la cellule et incorporé en quantité significative dans les particules virales lorsque Vpu n'est pas exprimé (résultats non montrés). Cette observation est davantage supportée par le résultat de la figure 3E, qui montre que des virus défectifs pour l'expression de Vpu et pseudotypés avec VSV-G possèdent le même potentiel infectieux qu'ils soient produits en présence ou en absence de CD4 et ce, même si CD4 est incorporé à des niveaux comparables (Fig. 3F). Ces résultats suggèrent que l'effet négatif de CD4 sur le potentiel infectieux des particules virales du VIH-1 implique non seulement le recrutement de CD4 dans la particule virale mais nécessite également une interaction entre CD4 et la gp120.

Figure 3. La diminution de l'expression de surface de CD4 et de son incorporation dans les virions contribue à l'infektivité du VIH-1 en augmentant le niveau d'Env fonctionnelle présente à la surface de la particule virale.

A. Les molécules de CD4 sont incorporées à la particule virale du VIH-1 lors de la morphogénèse virale. Les constructions provirales HxBH10-*vpu*⁺ (Vpu⁺) ou HxBH10-*vpu*⁻ (Vpu⁻) ont été co-transfectées dans les cellules 293T avec SVCMV-CD4wt (CD4wt) ou le plasmide contrôle (CD4⁻). Les virions ont été récoltés et concentrés par ultracentrifugation à partir des surnageants de culture clarifiés puis normalisés par un essai RT. Les virions ont ensuite été lysés, divisés en deux fractions équivalentes puis immunoprécipités (IP) en utilisant soit des anticorps monoclonaux dirigés contre CD4 (OKT4) ou un sérum anti-VIH-1 (α VIH-1). Les complexes immuns ont été séparés par électrophorèse, transférés sur membrane de nitrocellulose puis analysés par immunobuvardage (WB) en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre CD4 (α CD4) ou des anticorps monoclonaux reconnaissant soit la gp120 (α gp120) ou la p24 (α p24), tel qu'indiqué. Les résultats montrant l'Env liée et l'Env totale ne proviennent pas des mêmes expositions de l'autoradiogramme et par conséquent ne peuvent être comparés.

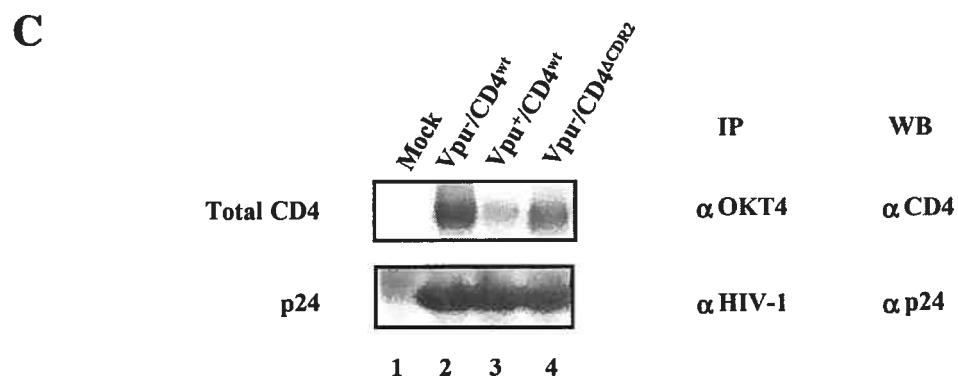
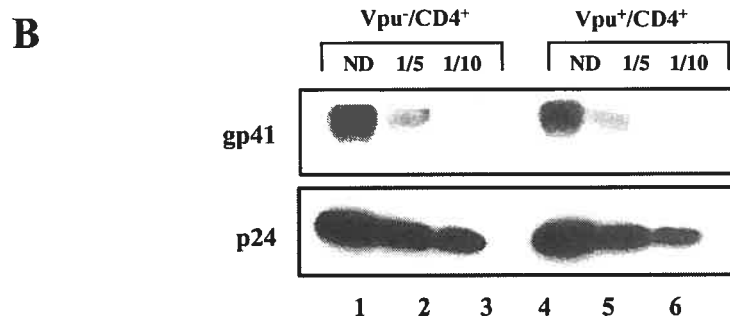
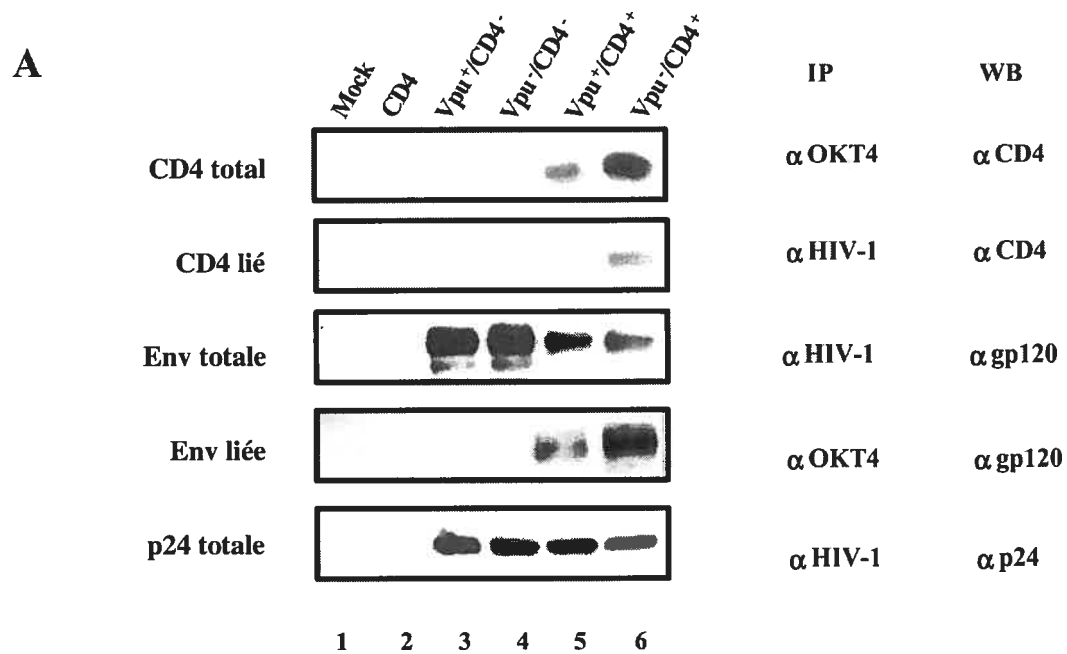
B. Effet de l'expression de CD4 à la surface de la cellule sur l'incorporation de gp41 dans la particule virale. Les virions, produits à partir de cellules 293T transfectées, ont été concentrés puis resuspendus dans du tampon de lyse RIPA. Des dilutions sérielles de lysat de virus ont été séparées par SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose puis analysées par immunobuvardage en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la gp41 ou contre la p24. ND:Non-dilué.

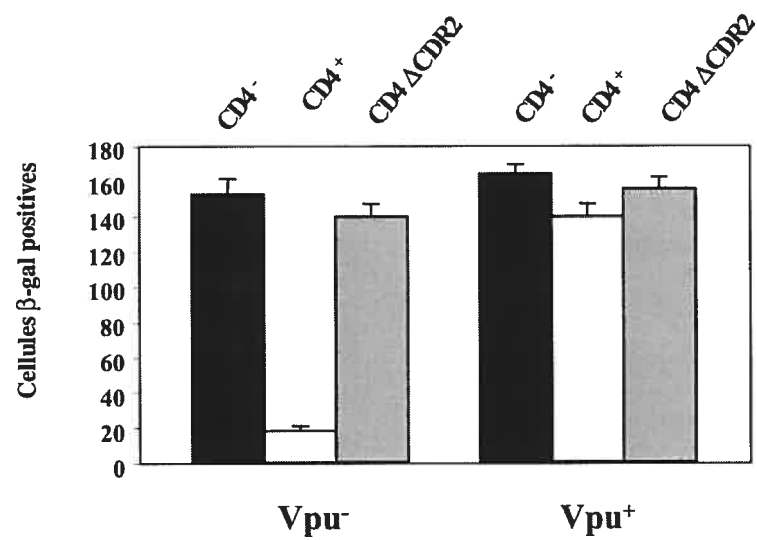
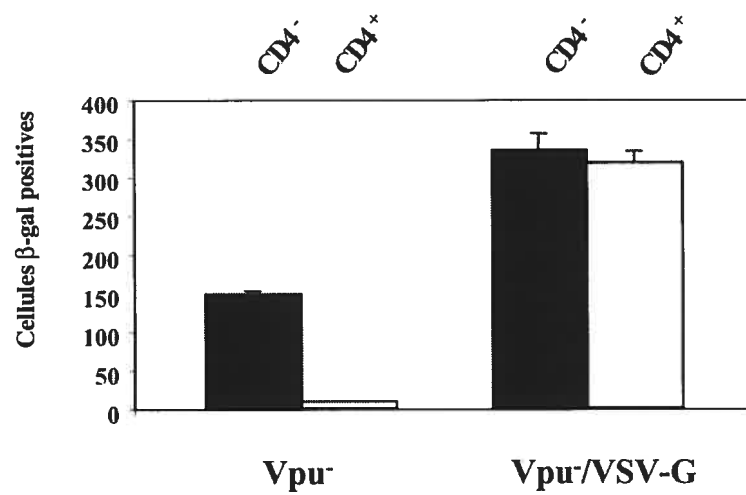
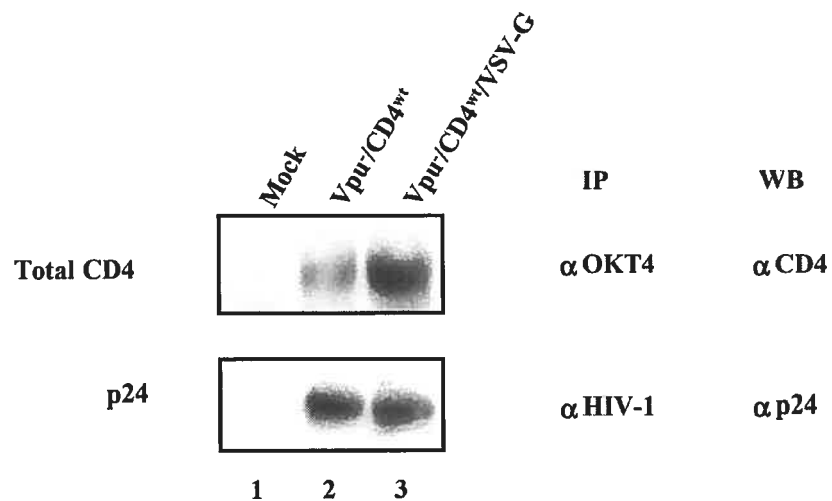
C. L'incorporation de CD4 au virion est indépendante de sa liaison à Env. Les constructions provirales HxBH10-*vpu*⁺ (Vpu⁺) ou HxBH10-*vpu*⁻ (Vpu⁻) ont été co-transfectées dans les cellules 293T avec SVCMV-CD4wt (CD4wt), SVCMV-CD4 Δ CDR2 ou le plasmide contrôle (CD4⁻). Les virions ont été récoltés puis immunoprécipités tel que décrit précédemment puis analysés par WB utilisant des anticorps dirigés contre CD4 (OKT4) ou la p24 (α p24).

D. Effet de l'expression de surface de CD4 sur l'infektivité du VIH-1. Les virus produits ont été récoltés tel que décrit précédemment puis la production virale déterminée en mesurant l'activité RT. L'infektivité des virus produits dans chaque culture a été évaluée par essai MAGI. Les résultats sont représentatifs des résultats obtenus dans au moins 4 expériences indépendantes.

E. Effet de l'expression de surface de CD4 sur l'infektivité des particules virales du VIH-1 Vpu-pseudotypées avec VSV-G. Les cellules 293T ont été cotransfectées avec la construction provirale HxBH10-*vpu*⁻ (Vpu⁻) et SVCMV-CD4 (CD4⁺) ou le plasmide contrôle (CD4⁻) en présence ou en absence de SVCMV-VSV-G. 48 heures post-transfection, les surnageants des cellules sont récoltés et l'infektivité des virus produits dans chaque culture a été déterminée par essai MAGI. Les résultats sont représentatifs des résultats obtenus dans au moins 3 expériences indépendantes.

F. CD4 est incorporé efficacement dans les virions pseudotypés avec VSV-G. La construction provirale HxBH10-*vpu*⁻ (Vpu⁻) ont été co-transfectées dans les cellules 293T avec SVCMV-CD4wt (CD4wt) avec ou sans SVCMV-VSV-G. Les virions ont été récoltés puis immunoprécipités tel que décrit précédemment puis analysés par WB utilisant des anticorps dirigés contre CD4 (OKT4) ou la p24 (α p24).



D**E****F**

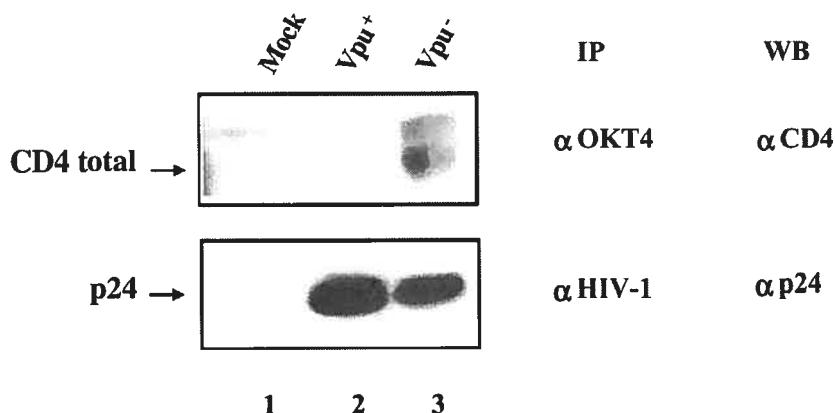
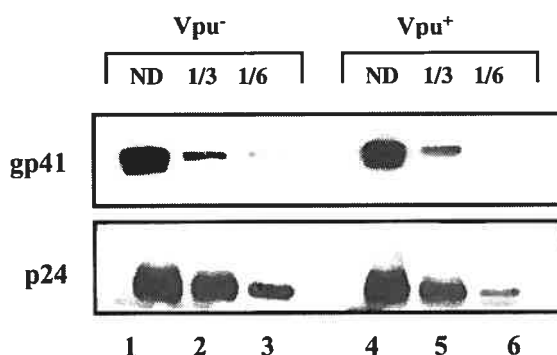
A**B**

Figure 4. Analyse des particules virales produites dans les cellules MT4. Les constructions provirales HxBH10-*vpu*⁺ (Vpu⁺) ou HxBH10-*vpu*⁻ (Vpu⁻) ont été transfectées dans les cellules T CD4⁺ MT4. Au jour 2, les virions ont été concentrés par ultracentrifugation à partir des surnageants de cultures clarifiés, normalisés par un essai RT puis lysés dans du RIPA. (A) Les lysats de virus ont été divisés en deux fractions équivalentes puis immunoprécipités en utilisant soit des anticorps monoclonaux dirigés contre CD4 (OKT4) ou un sérum anti-VIH-1 (αVIH-1). Les complexes immuns ont été séparés par électrophorèse, transférés sur membrane de nitrocellulose puis analysés par immunobuvardage (WB) en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre CD4 (CD4 total) ou des anticorps monoclonaux reconnaissant la p24 (p24), tel qu'indiqué. (B) Des dilutions sériées de lysat de virus ont été séparées par SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose puis analysées par immunobuvardage en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la gp41 ou contre la p24. ND:Non-dilué.

Afin d'approfondir davantage le mécanisme moléculaire sous-jacent à l'effet de la dégradation de CD4 induite par Vpu sur l'infectivité virale, nous avons ensuite voulu déterminer si l'expression de Vpu pouvait avoir une influence sur les niveaux de la glycoprotéine de l'Env qui sont incorporés dans les particules virales relâchées à partir de cellules T MT4 ou 293T exprimant CD4. La figure 3A-B et la figure 4B nous montrent que Vpu n'influence pas les niveaux de la glycoprotéine de l'Env associés au virus bourgeonnant puisque les quantités de gp41 et de gp120 associées aux virions sont comparables en présence ou en absence de Vpu (Fig. 3A lignes 5 et 6 Env totale et Fig. 3B ou 4B, comparer les lignes 4-6 avec les lignes 1-3). Tel que décrit précédemment par Lama *et al.* (291), les niveaux de gp120 associés aux virus sont constamment plus élevés dans les virions produits dans les 293T n'exprimant pas CD4 (CD4⁻) que dans les cellules exprimant CD4 (Fig. 3A comparer les lignes 3 et 4 avec les lignes 5 et 6, Env totale). Ce phénomène est indépendant de l'expression de Vpu et reflète fort possiblement la rétention de CD4 par la gp160 qui se produit au niveau du RE retardant le transport de l'Env et vraisemblablement son incorporation à la particule virale (547). Ces résultats indiquent que la dégradation de CD4 induite par Vpu n'entraîne pas une augmentation de l'incorporation de l'Env et conséquemment, dans nos conditions expérimentales, l'effet négatif de l'expression de CD4 sur l'infectivité virale ne peut être expliqué par une réduction de l'incorporation de l'enveloppe dans les virions.

Ensuite, nous avons voulu déterminer si les molécules de CD4 associées aux virions pouvaient interférer avec la fonction de l'enveloppe en diminuant l'habilité de l'Env incorporée aux virions à lier les molécules de CD4 présentes à la surface des cellules cibles. De manière spécifique, nous avons évalué si la gp120 et CD4 pouvaient se complexer l'un à l'autre au niveau de la particule virale et si l'expression de Vpu pouvait moduler la formation de tels complexes gp120-CD4. Les complexes gp120-CD4 associés aux virions ont été isolés par co-immunoprécipitation en utilisant soit des anticorps anti-VIH-1 ou anti-CD4 (OKT4) puis analysés pour la présence de CD4 lié ou de gp120 liée par immunobuvardage en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre CD4 ou la gp120. Les résultats de

la figure 3A montrent qu'en absence de Vpu (Vpu⁻), une fraction de la gp120 est associée à CD4 et inversement, une fraction de CD4 se retrouve complexée à la gp120 (ligne 6, CD4 lié, gp120 liée). L'expression de Vpu entraîne une diminution de la formation de ces complexes gp120-CD4 puisqu'avec une surexposition des autoradiogrammes, il existe une différence clairement apparente entre le niveau de gp120 liée lorsque Vpu est exprimé (comparer les lignes 5 et 6, gp120 liée; les résultats montrés pour l'Env liée et l'Env totale proviennent d'expositions différentes et conséquemment, ne peuvent être comparés). Par ailleurs, pour des temps d'exposition comparables au temps utilisé pour CD4 total, nous ne sommes pas en mesure de détecter de signal pour le CD4 lié lorsque Vpu est exprimé (comparer les lignes 5 et 6, CD4 lié). Ces résultats indiquent que le recrutement de CD4 dans la particule virale affecte le potentiel infectieux du VIH-1 en induisant la formation de complexes avec la gp120 présente à la surface du virion ce qui a pour effet de saturer les sites de liaison de CD4 sur les molécules de gp120 diminuant conséquemment les niveaux d'Env fonctionnelles présents dans les virions. De ce fait, Vpu, en diminuant l'expression de surface et l'incorporation de CD4 au virion, contrecarre ce phénomène et permet ainsi la relâche de particules virales pleinement infectieuses.

2.4 La diminution de l'expression de surface de CD4 induite par les activités de Vpu et Nef est requise afin que le VIH-1 ait un potentiel infectieux optimal

Au cours de l'infection par le VIH-1, Vpu et Nef induisent tous deux une diminution de l'expression de surface du récepteur CD4 (82). Afin d'évaluer la contribution relative de ces deux protéines sur l'infectivité du VIH-1, des cellules T CD4⁺ MT4 ont été transfectées avec des constructions provirales isogéniques à l'exception de l'expression de Vpu et/ou Nef. Trois jours post-transfection, l'infectivité des virions relâchés dans les surnageant de culture a été déterminée par essai MAGI en utilisant des quantités similaires de virus tel que déterminé par l'activité RT. Les résultats de la figure 5 indiquent que l'absence de Vpu ou Nef entraîne une perte du potentiel infectieux d'environ quatre fois comparativement au

virus complet. De plus, il semble y avoir un effet synergique plutôt qu'additif lorsque Vpu et Nef sont exprimés puisqu'en leur absence, on observe une diminution du potentiel infectieux de l'ordre de 20 à 30 fois comparativement au virus complet. Ce résultat indique que la diminution de l'expression de surface de CD4 induite par Vpu et Nef est nécessaire au cours de la réplication du VIH-1 afin de générer des particules virales au potentiel infectieux optimal.

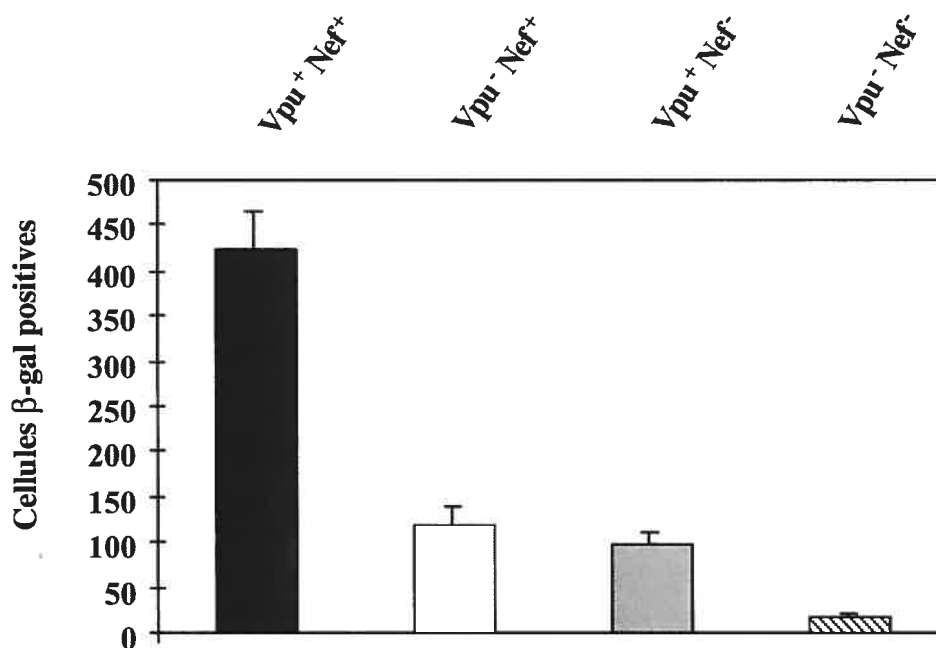


Figure 5. Effet de la diminution de l'expression de surface de CD4 induite par Vpu et Nef sur l'infectivité du VIH-1. Les constructions provirales isogéniques pNL4.3-*vpu*^{+/-}/*nef*^{+/-} ont été transfectées dans les cellules MT4. 72 heures post-transfection, les surnageants des cellules sont récoltés et la production virale déterminée par un essai RT. L'infectivité des virus produits dans chaque culture a été déterminée par essai MAGI. Les résultats sont représentatifs des résultats obtenus dans au moins 3 expériences indépendantes.

Chapitre 4

Étude du rôle de Vpu dans la morphogénèse virale et son importance dans le processus de relâche facilitée des particules virales

1. Préambule

Quoique les mécanismes et le rôle de la dégradation de CD4 médiée par Vpu lors de l'infection par la VIH-1 soient mieux compris, les mécanismes sous-jacents à l'augmentation de la relâche des particules virales restent à être élucidés. Des études de microscopie électronique ont démontré qu'en absence de Vpu, les particules virales présentaient des morphologies aberrantes (276, 562). En effet, dans ces conditions, une grande proportion des particules virales se retrouvent toujours en association avec la cellule et montrent des différences significatives de taille et de morphologie résultant quelquefois en la formation de particules virales possédant plusieurs capsides. Dans cette partie de mes travaux, nous nous sommes surtout intéressés à la seconde fonction de Vpu soit l'augmentation de la relâche de particules virales à partir de la cellule infectée ainsi qu'à son rôle dans la morphogénèse virale. Donc, en utilisant un système transitoire de production virale dans les cellules 293T, nous avons pu démontrer par microscopie électronique à balayage que des virus mutés pour Vpu forment de larges agrégats attachés à la surface cellulaire. La présence de ces agrégats est indépendante de l'expression de CD4. De plus, en utilisant différents mutants de relâche de Vpu qui maintiennent leur capacité à dégrader CD4, nous avons pu démontrer que l'apparition de ces morphologies était directement liée à la capacité de Vpu à faciliter le bourgeonnement des particules virales. Quoique morphologiquement différents, les virions agrégés à la cellule ne semblent toutefois pas présenter de différences quant à leur densité. L'effet de Vpu sur la morphogénèse ainsi que ses conséquences sur l'infectivité et la réplication du virus seront discutés dans ce chapitre.

Les images de microscopie électronique ont été réalisées par Mme Sylvia Zalzal grâce à une collaboration avec le laboratoire du Dr Antonio Nanci de la Faculté de médecine dentaire de l'Université de Montréal. De plus, Mme Linda Mark, stagiaire dans le laboratoire, a participé à la caractérisation biochimique des particules virales en effectuant les analyses d'immunobuvardage et les essais de transcriptase inverse afin de déterminer la densité des virions. Les résultats auxquels Mme Mark a participé sont présentés à la figure 5.

2. Résultats

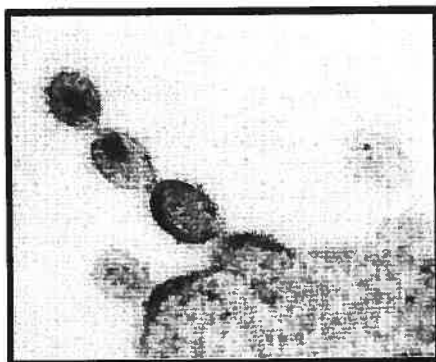
2.1 La protéine Vpu du VIH-1 influence la morphogenèse virale indépendamment de l'expression de CD4

Il a été démontré qu'en absence de Vpu, les virus produits à partir de cellules T ne sont pas relâchés efficacement et s'accumulent à la surface de la cellule (276, 562). Des études de microscopie électronique ont permis de mettre en évidence qu'une grande proportion des particules virales bourgeonnantes se retrouvent toujours en association avec la cellule et présentent des différences significatives de taille et de morphologie résultant quelquefois en la formation de particules virales possédant plusieurs capsides (Fig. 1; particules virales pointées). Dans la première partie de mes travaux, nous avons pu démontrer que l'expression de CD4 à la surface de la cellule entraînait la formation de complexes de haute affinité entre la glycoprotéine gp120 et le récepteur CD4 affectant par conséquent l'infectivité des particules virales produites (Chapitre 3). Ainsi, dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si l'accumulation de particules virales à la surface de la cellule observée en absence de Vpu et la présence de virions possédant plusieurs capsides pouvaient être le résultat direct de ces interactions Env/CD4. Les cellules 293T ont été cotransfectées avec les constructions provirales HxBH10-*vpu*⁺ (Vpu⁺), HxBH10-*vpu*⁻ (Vpu⁻) et l'expresseur SVCMV-CD4 ou le plasmide contrôle. 48 heures post-transfection, les cellules ont été fixées à la glutaraldéhyde puis traitées pour l'observation au microscope électronique à balayage. Toutes les images ont été réalisées à un grossissement de 20 000X.

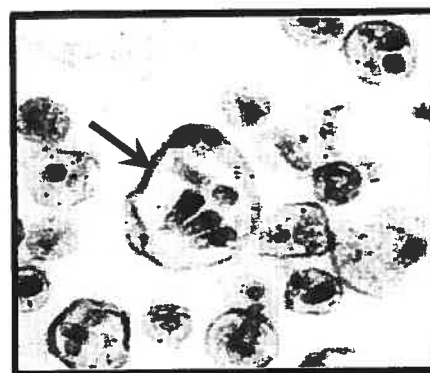
En présence de Vpu, les particules virales présentes à la surface de la cellule sont sphériques, d'une taille approximative de 100nm et possèdent une morphologie normale (Fig. 2, Vpu⁺). Toutefois, lorsque Vpu n'est pas exprimé, on peut observer la formation de larges agrégats à la surface de la cellule suggérant un défaut de morphogenèse important. À fort grossissement, ces agrégats semblent être la conséquence d'un problème de relâche efficace des particules virales puisqu'en observant attentivement, il apparaît que les agrégats sont le résultat de l'accumulation de nombreuses particules virales sphériques se regroupant sous forme de grappes



Yao *et al. J. AIDS*, 6:135-141, 1993



Klimkait *et al. J. Virol.*, 64:621-629



Klimkait *et al. J. Virol.*, 64:621-629

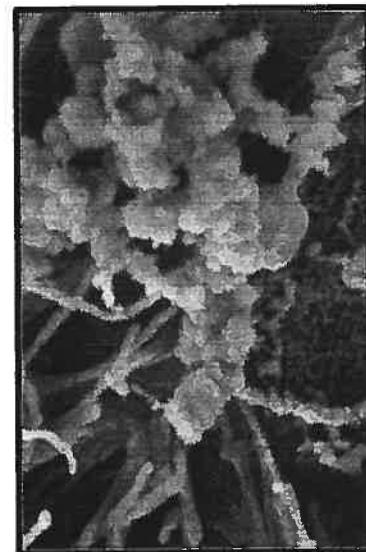
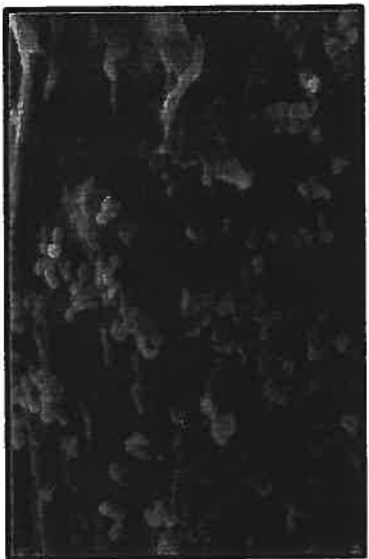
Figure 1. La protéine Vpu du VIH-1 influence la morphogénèse virale. En absence de Vpu, les virus produits à partir de cellules T s'accumulent à la surface de la cellule et ne sont pas relâchés efficacement. Des études de microscopie électronique ont permis de mettre en évidence qu'une grande proportion des particules virales bourgeonnantes se retrouvent toujours en association avec la cellule et présentent des différences significatives de taille et de morphologie résultant quelquefois en la formation de particules virales possédant plusieurs capsides (Indiqué par les flèches).

En absence de CD4



Vpu⁺

En présence de CD4



Vpu⁻

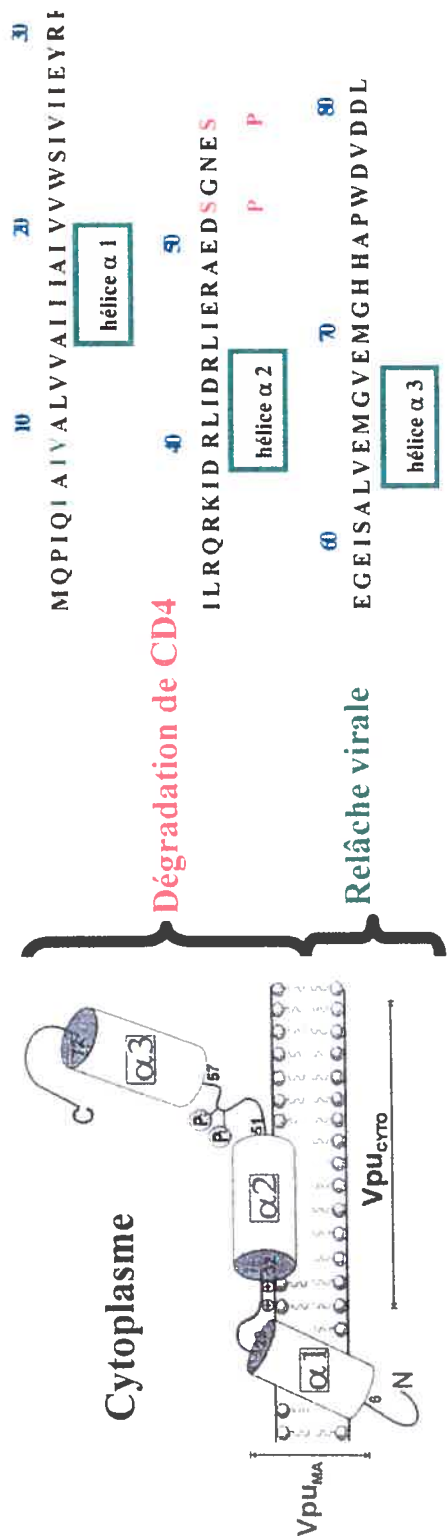


Figure 2. Vpu influence la morphogénèse virale indépendamment de l'expression de CD4. Microscopie électronique à balayage. Les cellules 293T ensemencées sur des lamelles de verre ont été cotransfectées avec 0,5 µg des constructions provirales HxBH10-*vpu*⁺ (Vpu⁺), HxBH10-*vpu*⁻ (Vpu⁻) et l'expressor SVCMV-CD4 ou le plasmide contrôle. 48 heures post-transfection, les cellules ont été fixées à la glutaraldéhyde puis traitées pour l'observation au microscope électronique à balayage. Grossissement = 20 000X.

donnant ainsi l'apparence d'agrégats de morphologie aberrante (Fig. 2, Vpu⁻). Finalement, l'apparition de ces agrégats ne semble pas liée à l'expression de CD4 puisque la morphologie des particules virales demeure similaire que CD4 soit présent ou non à la surface de la cellule (Fig. 2, en présence de CD4). Ainsi, la protéine Vpu du VIH-1 influence la morphogénèse virale et ce, indépendamment de l'expression de CD4. Conséquemment, la formation de complexes gp120/CD4 ne serait pas responsable de l'apparition des agrégats viraux à la surface des cellules infectées par un virus n'exprimant pas Vpu.

2.2 Vpu, par sa fonction de relâche facilitée des virions, influence la morphogénèse du VIH-1.

Étant donné que les défauts de morphogénèse observés en absence de Vpu ne semblent pas dépendre de l'expression du récepteur CD4 dans les cellules infectées, nous avons voulu déterminer si la fonction de relâche facilitée de Vpu pouvait être en cause. Ainsi, nous avons utilisé différents mutants de Vpu dont les phénotypes sont exclusivement associés soit à la perte de la fonction de relâche facilitée des particules virales de la cellule infectée (Vpu^{Ile6}), soit à l'absence de l'induction de la dégradation du récepteur CD4 au niveau du RE (Vpu^{52/56}) (Fig. 3) (174, 516). Les cellules 293T ont été transfectées avec les constructions provirales HxBH10-*vpu*⁺ (Vpu⁺), HxBH10-*vpu*⁻ (Vpu⁻), HxBH10-*vpu*^{52/56} (52/56), HxBH10-*vpu*^{Ile6} (Ile6). 48 heures post-transfection, les cellules sont fixées à la glutaraldéhyde puis traitées pour l'observation par microscopie électronique à balayage. Globalement, les résultats montrés à la figure 4 indiquent clairement que l'apparition des agrégats à la surface de la cellule est directement liée à la fonction de relâche facilitée médiée par Vpu puisque les virions produits en présence du mutant de dégradation de CD4 (Vpu^{52/56}) présente des morphologies comparables à celles observées lorsque la protéine Vpu de type sauvage est exprimée (Fig. 4, comparer Vpu⁺ et Vpu^{52/56}). Inversement, l'expression d'un mutant de relâche de (Vpu^{Ile6}) entraîne la formation de particules virales de morphologie aberrante similaire à ce qui est observé lorsque Vpu n'est pas exprimé (Fig. 4, Vpu^{52/56}). Des résultats similaires sont obtenus avec le mutant



Mutant	Substitutions	Stabilité	Relâche	Dégradation
Vpu ⁺	WT	+++	+++	+++
Vpu ⁻	ATG ⁻	---	---	---
Ile6	I6K-I8S-V9L	+++	---	+++
52/56	S52G/S56G	+++	++1/2	---

Figure 3. Séquence et phénotypes de différents mutants de Vpu. Les mutations affectant la relâche facilitée des particules virales sont indiquées en vert et les mutations affectant l'induction de la dégradation du récepteur CD4, en rouge. Les phénotypes associés aux mutations sont décrits dans le tableau. Le schéma de la structure de Vpu est tiré de Wray, V *et al.*, *Biochemistry*. 38:5272-82, 1999.

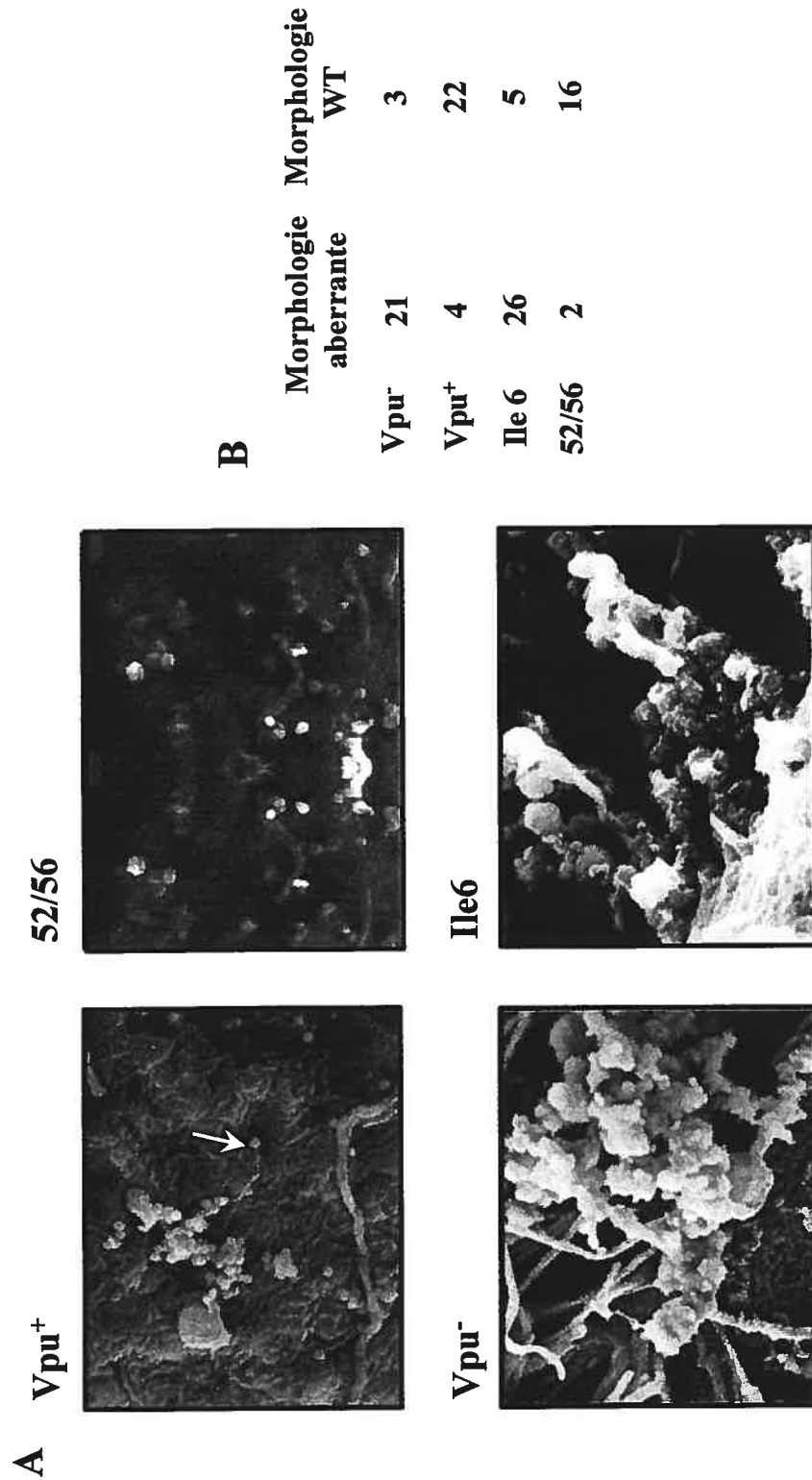


Figure 4. Vpu, par sa fonction de relâche facilitée des virions, influence la morphogénèse du VIH-1 A) Microscopie électronique. Les cellules 293T transfectées avec 0,5 µg des constructions provirales HxBH10-*vpu*⁺ (Vpu⁺), HxBH10-*vpu*⁻ (Vpu⁻), HxBH10-*vpu*^{52/56} (52/56), HxBH10-*vpu*^{Ile6}. 48 heures post-transfection, les cellules sont fixées à la glutaraldéhyde puis traitées pour l'observation par microscopie électronique à balayage. Grossissement = 20 000X. La flèche indiquant une particule virale de morphologie normale. B) Quantification des phénotypes morphologiques de type sauvage vs aberrant tel qu'observé par microscopie électronique à balayage. Les chiffres indiqués correspondent au nombre de champs comptés. Les champs sont choisis de manière aléatoire.

Vpu^{18V9} dont l'expression engendre également une perte de relâche facilitée (résultats non montrés) (516).

Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'il est tout de même possible d'observer des agrégats viraux et ce, même si Vpu est exprimé. Inversement, dans quelques rares cas, nous avons été en mesure d'observer des particules virales dont la morphologie n'est pas affectée par l'absence d'expression de Vpu. Toutefois, lorsque les phénotypes morphologiques de type sauvage et aberrant sont quantifiés, la corrélation entre la fonction de relâche et l'apparition des agrégats viraux demeure (Fig. 4). Donc, Vpu, par sa fonction de relâche facilitée des virions, influence la morphogénèse du VIH-1.

2.3 Les virions attachés à la surface de la cellule possèdent la même densité que les particules virales relâchées

Une des hypothèses pouvant expliquer la présence de particules virales de morphologie aberrante à la surface des cellules infectées n'exprimant pas Vpu pourrait être que les virions ne seraient pas relâchés efficacement dû au mauvais ciblage de Gag au site d'assemblage. Il a été démontré que le VIH-1 bourgeonne au niveau des radeaux lipidiques (312, 378). La composition lipidique de ces régions spécialisées de la membrane plasmique étant différente due à leur importante concentration de cholestérol et de sphingolipides, il est possible que les virions ne bourgeonnant pas au niveau de ces régions puissent présenter des densités différentes. Ainsi, nous avons voulu évaluer et comparer la densité des particules virales relâchées dans les surnageants et la densité des particules virales associées à la membrane plasmique. Les constructions provirales HxBH10-*vpu*⁺ (Vpu⁺) et HxBH10-*vpu*⁻ (Vpu⁻) ont été transfectées dans les cellules MT4. Au jour 3, les surnageants sont récoltés et les virus attachés à la cellule, détachés par vortex (276). Les virus sont alors concentrés puis soumis à une ultracentrifugation sur gradient de sucrose de 20-60%. Les différentes fractions sont récoltées puis analysées par immunobuvardage pour déterminer la distribution de la p24 dans le gradient et la RT mesurée. La densité de chacune des fractions est mesurée afin de s'assurer de la linéarité du gradient.

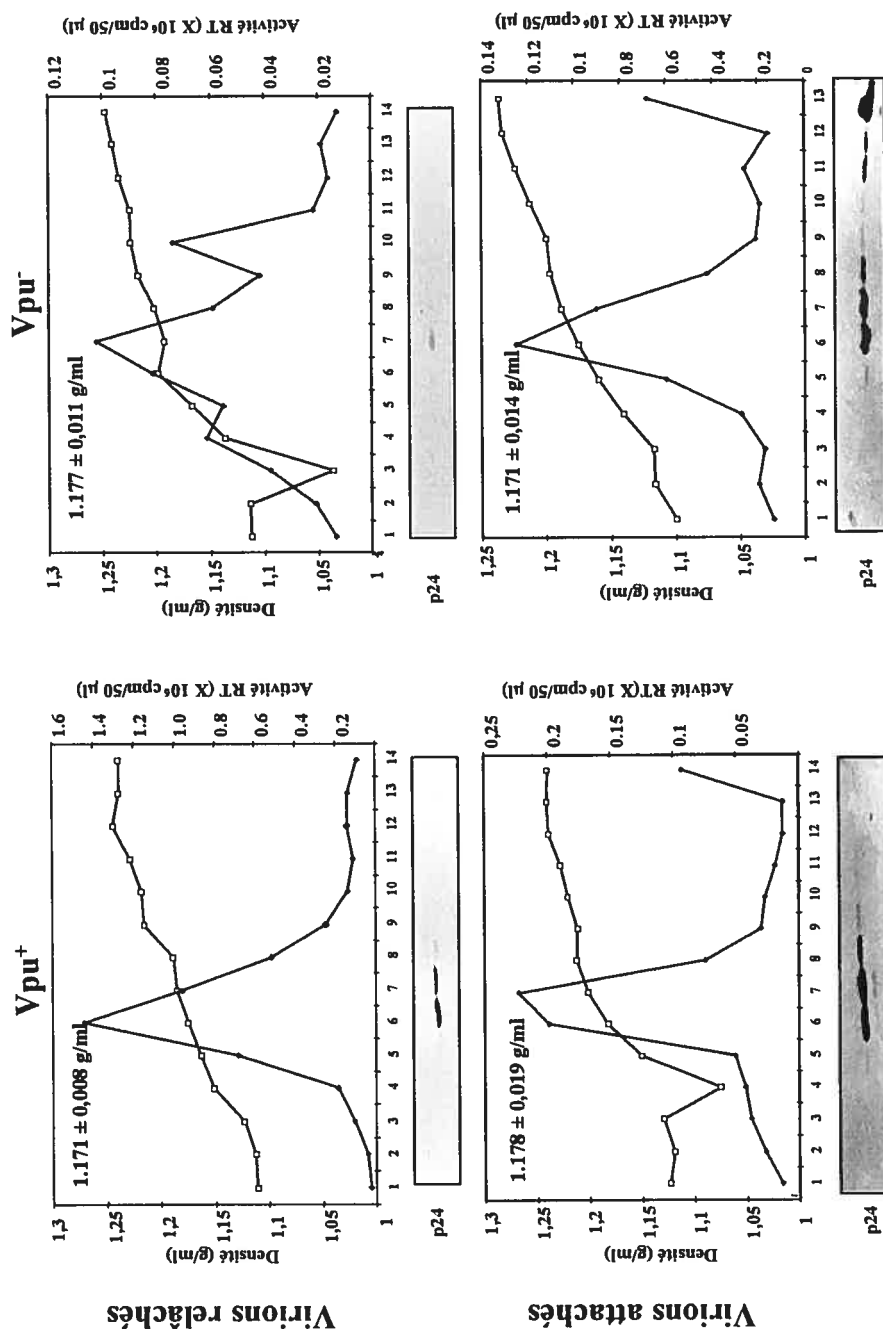


Figure 5. Les virions attachés à la surface de la cellule possèdent la même densité que les particules virales relâchées. Les constructions provirales HxBH10-*vpu*⁺ (*Vpu*⁺) and HxBH10-*vpu*⁻ (*Vpu*⁻) ont été transfectées dans les cellules MT4. Au jour 3, les surnageants sont récoltés et les virus attachés à la cellule, détachés par vortex. Les virus sont alors concentrés puis soumis à une ultracentrifugation sur gradient de sucrose de 20-60%. Les différentes fractions sont récoltées puis analysées par immunobuvardage pour déterminer la distribution de la p24 dans le gradient. La RT et la densité de chacune des fractions sont mesurées. Les densités moyennes mesurées pour 6 expériences indépendantes sont indiquées.

Les résultats présentés à la figure 5 nous montrent que peu importe la population virale, les densités des particules virales restent les mêmes. En effet, les densités moyennes mesurées pour 6 expériences indépendantes se situent toutes aux alentours de 1,17g/ml ce qui correspond à la densité établie du VIH-1 (134, 424). Donc, les virions attachés à la surface de la cellule possèdent la même densité que les particules virales relâchées que Vpu soit exprimé ou non. Dans l'ensemble, ces résultats nous montrent que l'apparition de morphologie aberrante n'affecte pas la densité des particules virales. Toutefois, vu les images obtenues en microscopie électronique, il est clairement évident que la taille des particules virales semble différente. Cependant, des études supplémentaires sur gradient de sucrose seraient nécessaires afin de définir dans quelle mesure la taille de ces agrégats est différente de celle des particules virales isolées. Par ailleurs, le fait que la densité des agrégats soit similaire à la densité des particules isolées n'exclut tout de même pas la possibilité que ce défaut de morphologie soit dû à un mauvais ciblage des composantes structurales du virus à la membrane au niveau de sites dont le ratio protéo-lipidique serait similaire à ce qui est observé au niveau du virion.

2.4 Les aberrations morphologiques observées en absence de Vpu permettent une meilleure adsorption du virus à la cellule cible

Des études sur la morphogénèse virale ont démontré que le potentiel infectieux des particules virales de morphologies aberrantes était affecté (424). Ainsi, maintenant que nous avons démontré que Vpu, par sa fonction de relâche facilitée, influence la morphogénèse virale, nous avons voulu déterminer si le défaut de morphogénèse engendré par l'absence d'expression de Vpu pouvait affecter l'infectivité des particules virales du VIH-1. Les constructions provirales HxBH10-*vpu*⁺ (Vpu⁺) et HxBH10-*vpu*⁻ (Vpu⁻) ont été transfectées dans les cellules 293T. 48 heures post-transfection, les surnageants sont récoltés et les virus attachés à la cellule, détachés par vortex. La production virale est évaluée par une mesure de l'activité RT. L'infectivité des virus produits dans chaque culture est évaluée par un essai MAGI. Dans la première partie de mes travaux, nous avons pu démontrer que dans un

système transitoire où CD4 n'est pas exprimé dans la cellule infectée, l'infectivité des virions relâchés est la même et ce, que Vpu soit exprimé ou non. Donc, dans un premier temps, nous avons voulu évaluer et comparer l'infectivité des virions relâchés dans le surnageant et l'infectivité des virions attachés à la cellule infectée. Les résultats de la figure 6 démontrent que lorsque Vpu est exprimé, aucune différence d'infectivité n'est observée et ce, que les virions soient associés à la cellule ou relâchés dans le surnageant. Par contre, on remarque que les virions produits en absence de Vpu et qui sont attachés à la cellule semblent 4 fois plus infectieux que les virions qui sont relâchés.

De ce fait, il a été démontré que l'inoculation du VIH-1 par centrifugation (spinoculation) permet d'augmenter l'efficacité d'adsorption des virions en facilitant le dépôt des particules virales sur la monocouche cellulaire (376). Ainsi, nous avons voulu savoir si, en absence de Vpu, les différences d'infectivité observées entre les virus attachés à la cellule et les virus relâchés étaient la conséquence d'une sédimentation plus efficace des agrégats viraux sur la monocouche de cellules Hela-LTR- β -gal et ce, dû à leur taille qui apparaît plus grande telle qu'observée par microscopie électronique. Les cellules Hela-LTR- β -gal ont été infectées avec les virions produits en absence ou en présence de Vpu. Ces virions sont soit attachés à la cellule ou relâchés dans le surnageant. Pendant la période d'adsorption, les cellules Hela-LTR- β -gal ensemencées dans des plaques de 24 puits sont mises en présence du virus puis spinoculées pour des durées variant de 0 à 2 heures. Tout d'abord, nous pouvons voir que les résultats de la figure 6 confirment que la spinoculation facilite les étapes de pré-entrée du virus. En effet, après 1 heure de spinoculation, nous obtenons en moyenne deux fois plus de cellules infectées pour atteindre une efficacité d'infection maximale après deux heures de spinoculation où le nombre de cellules infectées est quatre fois plus important que sans spinoculation (Fig. 6; Vpu⁺ relâché, Vpu⁻ relâché et Vpu⁺ associé à la cellule). Toutefois, le nombre de cellules Hela-LTR- β -gal infectées par les virions attachés à la surface de la cellule et produits en absence de Vpu n'est pas augmenté par la spinoculation.

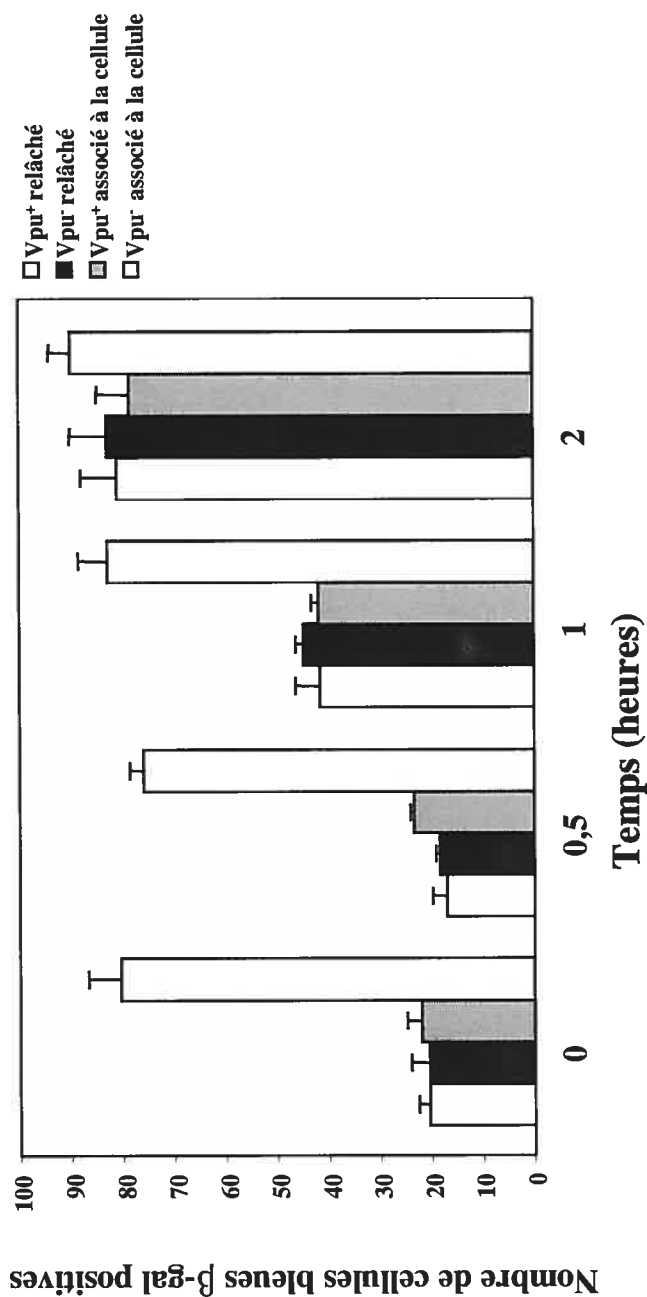


Figure 6. Les aberrations morphologiques observées en absence de Vpu permettent une meilleure adsorption du virus à la cellule cible. Les constructions provirales HxBH10-*vpu*⁺ (Vpu⁺) and HxBH10-*vpu*⁻ (Vpu⁻) ont été transfectées dans les cellules 293T. 48 heures post-transfection, les surnageants sont récoltés et les virus attachés à la cellule, détachés par vortex. La production virale est évaluée par une mesure de l'activité RT. L'infectivité des virus produits dans chaque culture est évaluée par un essai MAGI. Pendant l'infection, les cellules Hela-LTR-β-gal sont spinoculées pour des durées variant de 0 à 2 heures. Le nombre de cellules infectées par le VIH-1 est déterminé en comptant le nombre de cellules bleues β-gal positives. Les résultats sont représentatifs des résultats obtenus dans au moins 3 expériences indépendantes.

Ce qui suggère que l'attachement à la cellule cible des agrégats viraux présents à la surface des cellules infectées par un virus Vpu⁻ est probablement facilité par la taille des agrégats qui, étant plus lourd, sédimentent plus aisément sur la monocouche de cellules Hela-LTR- β -gal. Ainsi, après deux heures de spinoculation, toutes les populations virales ont le même potentiel infectieux, que les virions soient produits en absence ou en présence de Vpu ou encore qu'ils soient relâchés dans le surnageant ou en association avec la membrane plasmique. Donc, les aberrations morphologiques observées en absence de Vpu n'affectent pas le potentiel infectieux des particules virales quoique la présence de ces agrégats pourrait éventuellement faciliter la transmission de cellules à cellules des virus en permettant une meilleure adsorption du virus à la cellule cible.

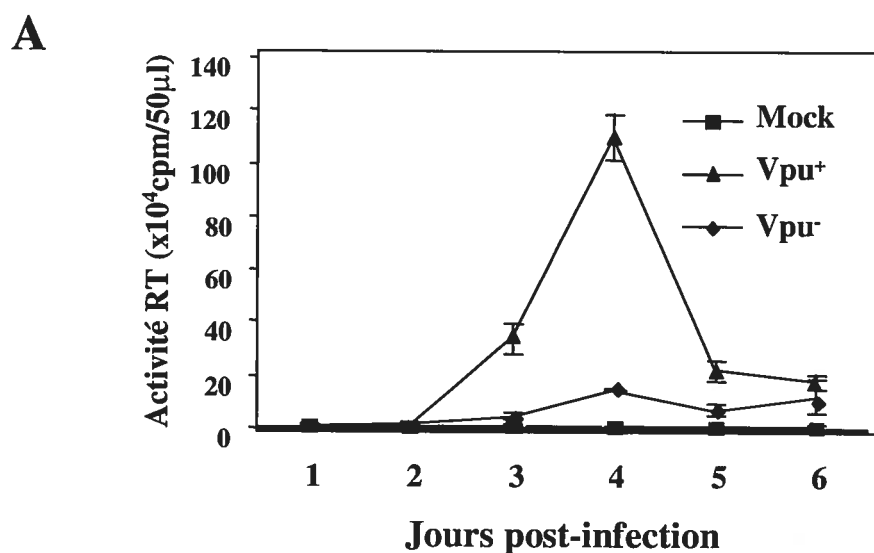
2.5 L'accumulation de particules virales à la surface de la cellule en absence de Vpu facilite la transmission virale de cellules à cellules et favorise l'apparition des effets cytopathiques

Une étude récente a mis en évidence que des virus défectifs pour l'expression de Vpu s'accumulaient à la surface de la cellule et se propageaient plus efficacement lors de transmission de cellule à cellule que des virus exprimant un Vpu de type sauvage (223). Lors des études de réplication du virus dans les cellules T, il est bien établi qu'il n'existe aucun délai dans l'apparition du point culminant de la production virale et ce, même si le potentiel infectieux des virus Vpu-défectif est grandement diminuer comparativement aux virus Vpu⁺ tel que démontré dans le chapitre 3 du présent ouvrage (Fig. 7A) (276). Cependant, lorsque nous étudions l'apparition des effets cytopathiques dans les cellules T CD4⁺ MT4, nous constatons que dans les cultures infectées avec un virus Vpu⁻, les syncytia apparaissent beaucoup plus rapidement. En effet, tel que décrit précédemment, le maximum de syncytia est observé au jour 4 dans les cultures Vpu⁻ comparativement au jour 5 pour les cultures Vpu⁺ (Fig. 7B) (562). Ainsi, l'absence de délai de réplication obtenu pour les virus défectifs pour Vpu peut en partie être expliqué par le fait que la propagation virale se produit principalement par transmission de cellules à cellules plutôt que par infection par des virus libres présents dans les fluides de culture. Cette transmission facilitée

par contact cellulaire pourrait alors compenser en partie pour la perte d'infectivité observée pour les virus Vpu^- et conséquemment entraîner une cinétique de réplication similaire à celle du VIH de type sauvage.

Nous avons donc voulu savoir si la présence de ces agrégats pourrait éventuellement faciliter la transmission de cellules à cellules des virus. Afin d'étudier indirectement la propagation de cellules à cellules, nous avons donc utilisé un système en transitoire nous permettant de mesurer l'efficacité de la fusion cellulaire. Les constructions provirales $HxBH10-vpu^+$ (Vpu^+) et $HxBH10-vpu^-$ (Vpu^-) ont été transfectées dans les cellules 293T. 48 heures post-transfection, les surnageants sont récoltés puis l'activité RT mesurée. Des quantités similaires de virus sont utilisées pour infecter la lignée indicatrice 1G5 qui exprime le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du LTR du VIH-1. 17 heures post-infection, on ajoute de l'AZT afin de limiter la propagation virale à un seul cycle d'infection et ainsi pouvoir mesurer l'augmentation de l'activité luciférase due à l'infection initiale de la cellule ainsi qu'à sa fusion subséquente avec une cellule non-infectée où la protéine Tat de la cellule infectée pourra transactiver le LTR-Luciférase de la cellule non-infectée. Les résultats présentés à la figure 7C indiquent qu'en absence de Vpu , la fusion entre les cellules se produit de manière beaucoup plus efficace qu'en présence de Vpu . En effet, l'activité luciférase est 12 fois plus importante dans les cultures infectées avec un virus Vpu^- qu'avec un virus Vpu^+ . Toutefois, lorsque des quantités croissantes d'anticorps neutralisants sont ajoutées aux cultures, on remarque une inhibition dose dépendante de la fusion entre les cellules infectées et non-infectées. En effet, lorsque des quantités optimales d'anticorps neutralisants sont ajoutées, on remarque que l'activité luciférase mesurée dans les cultures infectées par un virus Vpu^- se compare à l'activité luciférase mesurée pour les cultures infectées avec un virus Vpu^+ et ce, probablement dû à une diminution de la fusion cellulaire. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'accumulation de particules virales à la surface de la cellule en absence de Vpu pourrait faciliter la transmission virale de cellules à cellules et contribuer à l'apparition des effets cytopathiques en favorisant la fusion cellulaire. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que l'augmentation de la fusion cellulaire observée en absence de Vpu soit simplement le résultat d'une meilleure expression

de l'Env à la surface de la cellule dû au cadre de lecture muté de Vpu. Ainsi, il serait pertinent de réaliser cette même analyse en utilisant un mutant de Vpu affectant la relâche mais qui, contrairement au mutant de l'ATG, serait exprimé, tel le mutant Vpu^{Ile6}.



B

Formation de syncytia

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
Vpu ⁺	-	+/-	+	++	++++	+++ +/-	++
Vpu ⁻	+/-	+	++	+++++	+++ +/-	++++	+

Figure 7. L'accumulation de particules virales à la surface de la cellule en absence de Vpu facilite la transmission virale de cellules à cellules et favorise l'apparition des effets cytopathiques. A et B) Les cellules MT4 ont été infectées avec des quantités équivalentes de virus HxBH10-*vpu*⁺ (▲), HxBH10-*vpu*⁻ (◆) ou non-infectées (■). À des intervalles de temps réguliers suivant l'infection, les surnageants sont récoltés. La production virale est déterminée en mesurant l'activité RT et l'apparition des effets cytopathiques est quantifiée en évaluant la formation de syncytia.

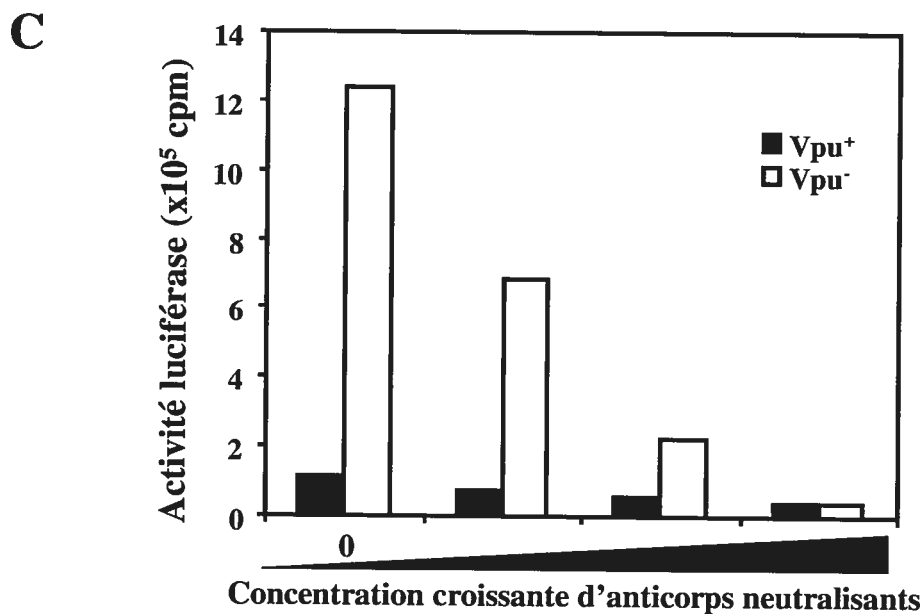


Figure 7 (suite). L'accumulation de particules virales à la surface de la cellule en absence de Vpu facilite la transmission virale de cellules à cellules et favorise l'apparition des effets cytopathiques. C) Essai d'infectivité utilisant la luciférase. Les constructions provirales HxBH10-*vpu*⁺ (Vpu⁺) et HxBH10-*vpu*⁻ (Vpu⁻) ont été transfectées dans les cellules 293T. 48 heures post-transfection, les surnageants sont récoltés puis l'activité RT mesurée. Des quantités similaires de virus sont utilisées pour infecter la lignée indicatrice 1G5 qui exprime le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du LTR du VIH-1. 17 heures post-infection, de l'AZT et des quantités croissantes d'anticorps neutralisants anti-CD4 et anti-gp-120 sont ajoutés. 48 heures post-infection, l'activité luciférase est mesurée.

Chapitre 5
Études des implications fonctionnelles de la dimérisation de la molécule CD4 lors de
l'infection par le VIH-1

1. Préambule

Finalement, la dernière partie de mes travaux porte sur la molécule CD4. La molécule CD4 est une glycoprotéine d'environ 55 KDa exprimée principalement à la surface des thymocytes, des lymphocytes T auxiliaires, des macrophages, des monocytes et des cellules de Langherans. Cette protéine transmembranaire est composée de 4 domaines extracellulaires (D1 à D4) présentant une homologie avec la superfamille des immunoglobulines, d'une région transmembranaire et d'une courte queue intracytoplasmique (352). La structure cristallographique de D1 à D4 de la molécule prédit un site d'homodimérisation situé en D4 (556). Outre ses fonctions lors de l'ontogénie des thymocytes, CD4 joue un rôle crucial lors de l'activation des lymphocytes T matures suite à la reconnaissance d'un antigène (352). Par ailleurs, CD4 a été identifié comme étant le principal récepteur du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) (326).

L'objectif principal de cette partie de mes travaux est d'identifier les composantes responsables de la multimérisation de CD4 et d'en définir les impacts fonctionnels lors de l'infection par le VIH-1. Des conditions semi-dénaturantes ont été mises au point afin de visualiser des formes multimériques de CD4 soit par immunoprécipitation, soit par Western blotting. Ces conditions ont également permis d'établir que p56^{lck} interagit avec la forme dimérique et/ou monomérique de CD4. Des études de mutagenèse du domaine D4 de CD4 réalisées dans le laboratoire du Dr Sékaly indiquent que ce site contribue à la dimérisation de la molécule, confirmant ainsi ce que prédisaient les études cristallographiques (556). De plus, leurs travaux ont également permis de démontrer qu'à la surface de la cellule, CD4 est présent sous forme dimérique. De ce fait, des études fonctionnelles ont été amorcées afin de vérifier l'importance de la dimérisation de CD4 lors de l'infection par le VIH-1. Des études préliminaires effectuées dans des lignées lymphocytaires isogéniques exprimant les mutants de dimérisation de CD4 semblent démontrer des délais substantiels de réplication du virus. Par conséquent, ces études pourraient éventuellement contribuer au développement d'approches pratiques permettant de mieux contrôler la réplication du VIH-I et ses conséquences pathogéniques.

Quelques uns des résultats présentés dans cette section ont fait l'objet d'une publication dans *Journal of Immunology* et ont été publiés grâce à une collaboration avec Maria-Cristina Moldovan et Abdelkader Yachou du laboratoire du Dr R.P. Sékaly de l'université de Montréal. La publication est présentée à l'annexe 2 du présent ouvrage.

Moldovan, M. C., Yachou, A., Levesque, K., Wu, H., Hendrickson, W. A., Cohen, E. A. and Sekaly, R. P. 2002. CD4 dimers constitute the functional component required for T cell activation. *J. Immunol.* **169** :6261-8.

2. Résultats

2.1 La molécule CD4 existe sous forme homo-oligomérique

Les études de cristallographie de CD4 ont permis de mettre en évidence que la molécule pouvait exister sous forme dimérique (556). La dimérisation et l'oligomérisation des récepteurs cellulaires constitue fréquemment une étape clé nécessaire aux récepteurs afin de médier leur fonction (222). Ainsi, dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si la molécule CD4 pouvait exister *in vivo* sous forme dimérique. Des conditions non-dénaturantes ont été mises au point afin de pouvoir visualiser ces dimères dans un système d'expression en transitoire. Les cellules COS-7 ont été transfectées avec l'expresseur SVCMV-CD4 (CD4) ou le plasmide contrôle (Mock). 48 heures post-transfection, les cellules sont lysées dans du tampon digitonine 0,5% puis les lysats immunoprécipités avec des anticorps monoclonaux dirigés contre CD4. Les complexes immuns sont séparés par électrophorèse en condition non-dénaturante, *i.e.* en absence de SDS et de β -ME, transférés sur membrane de nitrocellulose puis analysés par immunobuvardage en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre CD4. L'anticorps OKT4 utilisé pour les immunoprécipitations interagit avec CD4 au niveau du domaine D3 ce qui par conséquent ne devrait pas interférer avec la formation des dimères. Donc, par immunobuvardage, nous avons été en mesure de mettre en évidence des complexes

protéiques dont les masses moléculaires approximatives de 55, 110 et 220 kDa correspondent à la taille estimée que prendraient les formes monomériques, dimériques et tétramériques de CD4 (Fig. 1A). Ces résultats démontrent également que l'oligomérisation de CD4 est indépendante de la présence de protéines spécifiques aux lymphocytes T telle la tyrosine kinase p56^{lck} (Fig. 1A-B).

Dans les cellules T, l'expression de surface de CD4 est maintenue grâce à son association avec la tyrosine kinase p56^{lck} (397). Nous avons donc voulu déterminer si les oligomères de CD4 pouvaient interagir avec la tyrosine kinase p56^{lck}. Les expresseurs SVCMV-CD4 ou SVCMV-CD4^{C4202A} ont été co-transfectés dans les cellules COS-7 avec l'expresseur SVCMV-p56lck ou le plasmide contrôle. 48 heures post-transfection, les cellules sont radiomarquées, lysées dans du tampon digitonine 0,5% puis immunoprécipitées avec des anticorps monoclonaux dirigés contre CD4 (OKT4). Lorsque CD4 et la tyrosine kinase p56^{lck} sont simultanément exprimées, nous observons la présence de trois bandes supplémentaires correspondant vraisemblablement à la p56^{lck} (lck), au dimère de CD4 en association avec une molécule de p56^{lck} (D-lck) et au dimère de CD4 en association avec deux molécules de p56^{lck} (D-lck-lck) (Fig. 1B). Lorsque l'expresseur SVCMV-CD4^{C4202A}, un mutant de CD4 ayant perdu la capacité de se lier à p56^{lck}, est co-transfecté avec la tyrosine kinase, ces bandes supplémentaires disparaissent indiquant qu'elles sont le résultat de l'interaction de CD4 avec p56lck. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que CD4 est capable d'homo-oligomérisation indépendamment de la présence de protéines spécifiques aux lymphocytes T et que la forme dimérique de CD4 interagit avec la tyrosine kinase p56^{lck}.

2.2 La dimérisation de la molécule CD4 semble être importante pour la réplication du VIH-1

Maintenant que nous avons démontré que CD4 existe *in vivo* sous forme dimérique, nous avons voulu déterminer si la dimérisation de CD4 pouvait être importante lors de l'infection par le VIH-1. Des études effectuées au sein du laboratoire du Dr Sékaly ont permis d'établir que le domaine D4 de CD4 était impliqué dans la dimérisation de la molécule. De manière plus précise, les résultats

obtenus ont permis de démontrer l'importance des acides aminés K318 et Q344 dans la formation des dimères de CD4 (Annexe 2). Ces acides aminés sont situés dans l'interface de dimérisation de CD4 tel que prédit par la structure cristallographique de la molécule. Donc, afin d'évaluer l'importance de la dimérisation du récepteur CD4 dans l'infection par le VIH-1, nous avons utilisé des lignées stables A2.01 générées dans le laboratoire du Dr Sékaly exprimant divers mutants ponctuels situés dans l'interface de dimérisation de CD4. Les lignées ont été infectées avec des quantités équivalentes de virus pNL4.3. À des intervalles de temps réguliers, les surnageants des cultures ont été récoltés. La production virale a été évaluée par un essai RT. Les résultats présentés à la figure 2 indiquent que la dimérisation de CD4 pourrait être importante lors de la réplication du VIH-1. En effet, dans la lignée MA15 exprimant la molécule CD4 de type sauvage, le maximum de la production virale est atteint au 18^e jour de la cinétique de réplication du virus. Des résultats similaires sont obtenus pour la lignée exprimant un mutant de CD4 dont le phénotype de dimérisation n'est pas affecté (Fig.2, N358R). Toutefois, lorsque des lignées exprimant des mutants entraînant la perte de dimérisation de CD4 (Fig.2, K318E ou Q344E) sont infectées, la production virale débute vers le jour 18 et n'a toujours pas atteint son apogée au 33^e jour de la cinétique. Donc, la perte de dimérisation de CD4 entraîne des délais substantiels de la réplication du VIH-1; délai occasionnant un retard d'au moins 12 à 15 jours dans l'apparition du maximum de réplication virale.

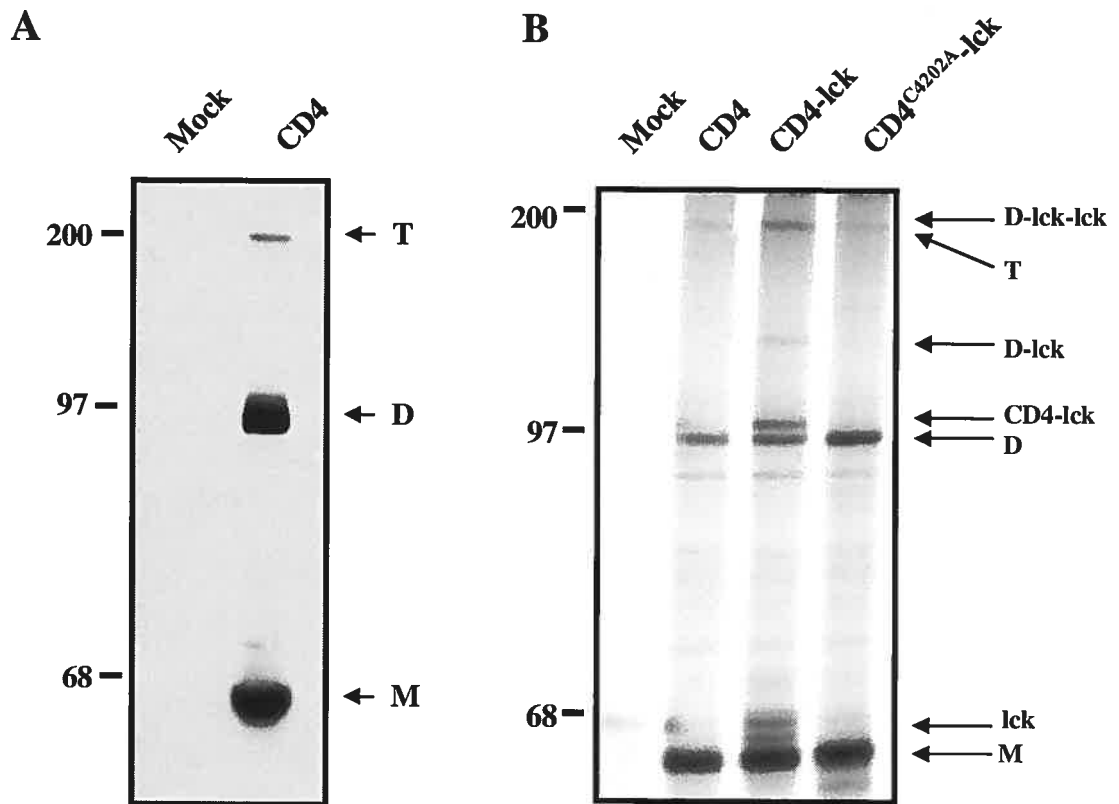


Figure 1. La molécule CD4 existe sous forme monomérique, dimérique et tétramérique. A. CD4 existe sous forme multimérique. Les cellules COS-7 ont été transfectées avec l'expresser SVCMV-CD4 (CD4) ou le plasmide contrôle (Mock). 48 heures post-transfection, les cellules sont lysées dans du tampon digitonine 0,5% puis immunoprécipitées avec l'OKT4. Les complexes immuns sont séparés par électrophorèse en condition non-dénaturante, transférés sur membrane de nitrocellulose puis analysés par immunobuvardage en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre CD4.

B. Les dimères de CD4 interagissent avec p56lck. Les expressers SVCMV-CD4 ou SVCMV-CD4^{C4202A} ont été co-transfectés dans les cellules COS-7 avec l'expresser SVCMV-p56lck ou le plasmide contrôle. 48 heures post-transfection, les cellules sont radiomarquées, lysées dans du tampon digitonine 0,5% puis immunoprécipitées avec des anticorps monoclonaux dirigés contre CD4 (OKT4) tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. M représente les monomères, D, les dimères et T, les tétramères.

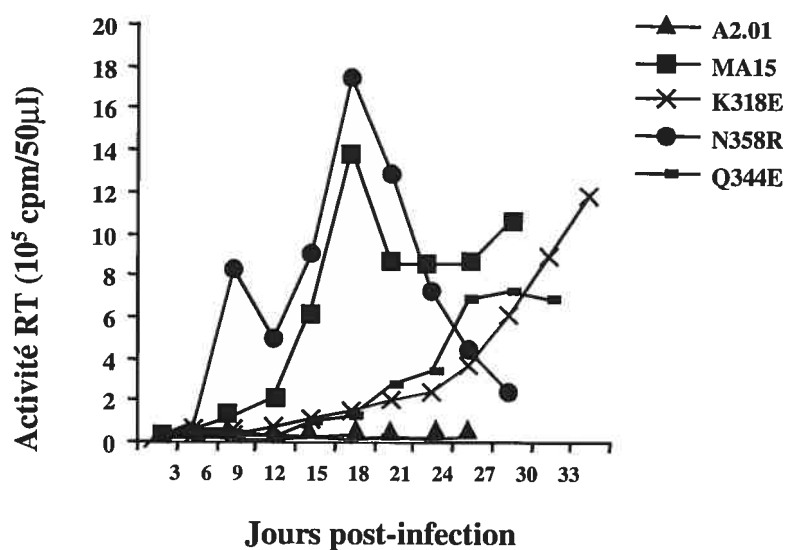


Figure 2. La dimérisation de la molécule CD4 semble être importante pour la réplication du VIH-1. Les lignées stables A2.01 exprimant divers mutants de CD4 à des niveaux comparables tel que déterminé par analyse de FACS ont été infectées avec des quantités équivalentes de virus pNL4.3. À des intervalles de temps réguliers, les surnageants des cultures ont été récoltés. La production virale a été évaluée par un essai RT. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois.

Chapitre 6
Discussion et conclusion

DISCUSSION

Rôle de la protéine virale Vpu dans le cycle de multiplication du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)

Outre les gènes *gag*, *pol* et *env* normalement retrouvés chez tous les rétrovirus, le VIH possède plusieurs cadres de lecture supplémentaires codant pour les gènes accessoires *vif*, *vpr/vpx*, *vpu* et *nef*. Contrairement aux autres protéines accessoires, Vpu est unique au VIH-1 et à quelques isolats simiens dont le SIV_{cpz} (250). La protéine Vpu possède deux principales fonctions biologiques au cours de l'infection par le VIH-1: i) Vpu facilite la relâche de particules virales bourgeonnantes par un mécanisme indépendant de l'expression du récepteur CD4 et de la glycoprotéine de l'Env (504, 563); et ii) Vpu induit la dégradation ciblée du récepteur CD4 au niveau du RE (546). Quoique les conséquences de l'augmentation de la relâche de particules virales médiée par Vpu au cours de l'infection par le VIH-1 apparaissent évidentes – augmenter la propagation virale – le rôle de la dégradation de CD4 initiée par Vpu demeure, quant à lui, incertain. Cette activité de Vpu sur CD4 doit certainement constituer un avantage sélectif non négligeable pour le virus puisque le VIH-1 encode deux autres protéines contribuant également à diminuer l'expression de surface du récepteur CD4 : Nef et le précurseur gp160 de l'Env, deux protéines agissant à des étapes distinctes du cycle de multiplication du virus. De nombreuses hypothèses ont été proposées afin d'expliquer la signification fonctionnelle de cette diminution de l'expression de CD4 pendant l'infection. Tout d'abord, l'élimination du récepteur viral de la surface de la cellule pourrait prévenir certains effets cytopathiques résultant d'une infection multiple (24). Alternativement, la diminution de l'expression de CD4 pourrait représenter un moyen efficace pour le virus de prévenir la capture et l'agrégation des virions bourgeonnants à la surface de la cellule; phénomène qui n'est pas sans rappeler la fonction de la protéine neuraminidase du virus de l'influenza (390).

Au cours de mes travaux, nous avons pu mettre en évidence que la dégradation de CD4 induite par Vpu permet la relâche de particules virales pleinement infectieuses puisque la protéolyse du récepteur empêche son

accumulation à la surface de la cellule et son incorporation subséquente dans les virus bourgeonnants. En effet, l'accumulation de molécules de CD4 à la surface de la cellule et son incorporation dans les virions produits en absence de Vpu entraînent des conséquences délétères pour l'infectivité virale et ce, due à l'augmentation de la formation de complexes gp120/CD4 à la surface du virus, réduisant conséquemment le niveau d'Env fonctionnelle dans le virion. Ainsi, mes travaux ont permis d'établir un lien fonctionnel entre la dégradation de CD4 induite par Vpu et le cycle d'infection du VIH-1 ainsi que la pathogenèse associée à l'infection puisque nous démontrons qu'il existe un lien direct entre le potentiel infectieux du VIH-1 et la capacité de Vpu à initier la dégradation de CD4.

Plusieurs évidences nous indiquent que l'effet de Vpu sur l'infectivité virale corrèle étroitement avec l'expression de CD4 à la surface de la cellule. Tout d'abord, les virus défectifs pour l'expression de Vpu ne montre pas une perte de leur potentiel infectieux lorsque produit dans des cellules n'exprimant pas CD4 (Chap.3; Fig. 1C, D et F). Ensuite, l'effet inhibiteur de CD4 sur le potentiel infectieux des virus Vpu⁻ est dose-dépendant et directement proportionnel au niveau de CD4 exprimé à la surface de la cellule. (Chap.3; Fig. 1A et B, E et F). De plus, nous avons démontré qu'un mutant de CD4 qui n'est pas sensible à l'action de Vpu et qui par conséquent n'est pas dégradé affectait l'infectivité virale du VIH-1. De même, un mutant de Vpu n'induisant pas la dégradation de CD4 est incapable de restaurer le potentiel infectieux des virus à un niveau comparable à celui obtenu lorsque que Vpu est de type sauvage. Ces résultats établissent un lien direct entre l'effet de Vpu sur l'infectivité virale et sa capacité à induire la dégradation de CD4. (Chap.3; Fig. 1D). Il est important de mentionner que nos résultats ne sont pas uniquement obtenu dans un système transitoire où CD4 se retrouve en surexpression, telles les cellules 293T transfectées, mais sont également obtenus dans des lignées de cellules T CD4⁺ MT4 et Jurkat ainsi que dans des cellules primaires comme les PBMCs renforçant ainsi l'importance *in vivo* de ce phénomène à des niveaux d'expression de CD4 reflétant les niveaux physiologiques exprimés à la surface des cellules cibles infectées par le VIH-1.

Une des hypothèses généralement acceptée est que la dégradation du récepteur CD4 induite par la protéine Vpu du VIH-1 contribue à relâcher la glycoprotéine de l'Env retenue dans le RE ce qui permet sa maturation, son transport et son incorporation aux particules virales bourgeonnantes (547). Nos résultats indiquent que la perte de l'infectivité observée en absence de Vpu corrèle plutôt avec l'augmentation de l'expression de surface de CD4 et son incorporation subséquente à la particule virale qu'avec une diminution du niveau d'Env incorporés dans le virion. En fait, quoique les virus Vpu⁺ ou Vpu⁻ présentent des différences d'infectivité marquées, le niveau de gp41 associé au virus demeure comparable dans les deux cas (Chap.3; Fig. 3B et Fig 4B). Cependant, ce résultat n'exclut pas la possibilité que la dégradation de CD4 puisse entraîner une augmentation de la libération du précurseur de l'Env du RE tel que déjà rapporté (547). Toutefois, cette libération plus efficace ne se traduit pas par une incorporation accrue de la glycoprotéine de l'Env dans les virions. Par ailleurs, ce résultat indique également que la perte d'infectivité observée pour les virus n'exprimant pas Vpu n'est pas la conséquence d'une incorporation moins importante de l'Env dans les virions.

L'effet de Vpu sur l'infectivité virale corrèle fortement avec la capacité de CD4 à lier la gp120. En effet, l'expression à la surface de la cellule et l'incorporation d'un mutant de CD4 incapable de lier la gp120 n'affecte en rien l'infectivité virale des virus produits en l'absence de Vpu (Chap.3; Fig. 3D). Par ailleurs, l'incorporation à proprement parlé de CD4 au niveau de la particule virale ne semble pas affecter l'infectivité virale en modifiant l'architecture générale de la particule virale puisque le pseudotypage des virus n'exprimant pas Vpu avec la glycoprotéine VSV-G rétablit entièrement le potentiel infectieux des virions (Chap.3; Fig. 3E). Donc, le modèle le plus probant émergeant de ces résultats pourrait être que le recrutement de CD4 au niveau du virion affecte l'infectivité du VIH-1 en induisant la formation de complexes avec la gp120 à la surface du virus ce qui a pour effet de saturer les sites de liaisons de CD4 sur les molécules de gp120 diminuant ainsi le niveau d'Env fonctionnelle présentes à la surface des virions. Donc, Vpu, en diminuant l'expression de surface de CD4 et son incorporation dans les particules virales, réduit cette interférence en permettant la relâche de virion possédant des Env

fonctionnelles capables de se lier avec les molécules de CD4 présentes à la surface des cellules cibles. Finalement, malgré que nos résultats indiquent que la diminution de l'expression de surface induite par Nef et Vpu soit requise pour obtenir un potentiel infectieux optimal, il est difficile d'éliminer que l'effet synergétique observé sur le potentiel infectieux (Chap.3; Fig. 5) soit uniquement associé à l'effet de Nef sur l'endocytose de CD4 puisqu'il est bien établi que Nef peut contribuer à l'infectivité virale indépendamment de son action sur CD4 (87).

La capacité du VIH à moduler négativement l'expression de surface de CD4 représente un facteur important de la pathogenèse virale et confère probablement un avantage sélectif au virus lors de la réplication *in vivo*. À cet effet, plusieurs études récentes ont permis de mettre en évidence que la diminution de l'expression de CD4 médiée par Vpu et/ou Nef contribue à la propagation virale (41, 104, 291, 437, 507). Toutes ces études démontrent qu'une forte expression de CD4 à la surface de la cellule infectée interfère avec la production de particules virales infectieuses; les mécanismes proposés étant toutefois différents. Ross *et al.* ont démontré que la surexpression de CD4 dans les cellules fibroblastiques 293T exprimant le VIH-1 entraîne une diminution globale de la relâche de particules virales sans toutefois altérer le potentiel infectieux des virions relâchés (437). Cette étude démontre que cette inhibition de la relâche virale est dépendante de l'interaction spécifique intervenant entre CD4 et la glycoprotéine de l'enveloppe virale. Par ailleurs, ils ont également démontré que l'expression de Nef pouvait efficacement abolir cette inhibition de la relâche de particules virales. Dans l'ensemble, les auteurs proposent que l'inhibition de la relâche des virions serait la conséquence directe de l'attachement des molécules de CD4 présentes à la surface cellulaire avec l'enveloppe des virions bourgeonnants entraînant ainsi une rétention des particules naissantes à la surface de la cellule (Fig. 1C). Cependant, des études subséquentes ont prouvé que quoique ce phénomène soit possible, il ne peut être démontré qu'à des concentrations de CD4 qui ne sont pas physiologiques (104). Par ailleurs, Bour *et al.* ont également mis en évidence que l'expression de CD4 à la surface de la cellule inhibe la relâche de particules virales mais ce, indépendamment de l'expression de l'Env (41). Ainsi, les auteurs ont suggéré que CD4 agissait en empêchant Vpu de médier sa fonction de relâche facilitée des virions. L'infectivité des

virions n'a pas été analysée dans cette étude. Par ailleurs, Lama *et al.* ont démontré que l'expression de CD4 à la surface de la cellule infectée induit une réduction drastique du potentiel infectieux des virions relâchés (291). Les auteurs montrent que la perte d'infectivité observée en présence d'une forte expression de CD4 serait le résultat d'un phénomène de séquestration de l'Env loin des sites d'assemblage induit par CD4 ce qui par conséquent entraînerait une diminution de l'incorporation de l'Env dans les particules virales bourgeonnantes (Fig. 1D). Tandis que l'effet de Nef sur l'incorporation de l'Env dans ces études est bien marqué, l'effet de Vpu quant à lui, n'apparaît pas aussi clairement. L'analyse biochimique des protéines virales a permis de mettre en évidence qu'en absence de Vpu et/ou Nef, CD4 peut être incorporé à la particule tout en bloquant efficacement l'incorporation de l'Env dans les virions. Plus récemment, Cortes *et al.* ont confirmé ces résultats dans les lignées Jurkat T et ont ainsi montré que CD4, lorsqu'exprimé à des niveaux physiologiques, interfère de manière enveloppe-dépendante avec le potentiel infectieux des particules virales relâchées (104). Quant à Tanaka *et al.*, leur étude a permis de confirmer les résultats obtenus au cours de nos travaux *i.e.* qu'en absence de Vpu, l'incorporation de CD4 dans le virion entraîne la formation de complexes CD4/Env diminuant ainsi le niveau d'Env fonctionnelle à la surface du virion ce qui a pour effet de diminuer drastiquement le potentiel infectieux des particules virales (Fig. 1B) (507). Ces résultats ont d'ailleurs été suggérés par une étude de Hartley *et al.* qui montre que des virus produits en absence de CD4 ont une capacité d'interaction subséquente avec CD4 qui est de 100 à 10 000 fois plus élevée que lorsque que les virus sont produits dans des cellules exprimant CD4 (230). Donc, toutes ces études ont permis de mettre clairement en évidence que l'expression de surface de CD4 représente un facteur pouvant influencer l'assemblage et la relâche des particules virales entraînant ainsi des conséquences marquées sur la propagation virale.

À présent, on ne peut toujours pas expliquer les différences observées quant au niveau d'Env incorporé dans les virions en présence ou en absence de Vpu et/ou Nef. En effet, contrairement à Lama *et al.*, en utilisant des virus Nef⁻ isogéniques sauf pour l'expression de Vpu, nous n'avons pas pu mettre en évidence une telle inhibition de l'incorporation de l'Env lorsque les virus sont produits en absence de Vpu suggérant que les mécanismes par lesquels Nef et Vpu contribuent à l'infectivité

virale sont complémentaires quoique distincts. Par ailleurs, il est bien établi que l'Env du VIH-1 peut être endocytosée par la machinerie cellulaire utilisant les molécules adaptatrices de clathrine (440). Cette même machinerie est ciblée par Nef afin de médier l'internalisation du récepteur CD4 (219). Donc, il est possible que le niveau plus important d'Env associé au virion lorsque Nef est exprimé puisse être la conséquence d'une redirection de la machinerie endocytaire induite par Nef afin d'initier l'internalisation de CD4 diminuant conséquemment l'endocytose de l'Env et permettant ainsi une meilleure incorporation de l'Env dans la particule virale bourgeonnante. Des expériences visant à analyser la contribution relative de Nef et de Vpu dans le processus de la diminution de l'expression de CD4 pourrait ainsi être envisagées afin de déterminer les répercussions réelles de ce phénomène sur la fonction de l'Env.

Il apparaît de plus en plus évident que les fonctions des protéines accessoires du virus contribuent à la pathogenèse virale *in vivo*. Quoique certaines études aient pu mettre en lumière l'importance de l'expression de Nef et Vpu lors de la propagation virale dans des modèles de singe, les données concernant l'importance de la protéolyse du récepteur CD4 *in vivo* commencent à peine à émerger. Récemment, dans un modèle de souris SCID, il a été démontré que la capacité de Nef à diminuer l'expression de CD4 corrélait avec une déplétion sévère des thymocytes sans toutefois affecter la réplication du virus (502). Par ailleurs, une étude réalisée chez le macaque a permis de démontrer qu'un virus SHIV possédant un cadre de lecture non fonctionnel pour la protéine Vpu acquerrait rapidement des mutations compensatoires au niveau des gènes de l'*env* et de *nef* suggérant que le virus pourrait chercher à optimiser l'induction de la diminution de l'expression de surface de CD4 par d'autres mécanismes telle l'accélération de l'endocytose du récepteur (488). Par ailleurs, des résultats non publiés ont permis de confirmer davantage l'importance de la dégradation de CD4 dans l'infection par le VIH. En effet, en utilisant le modèle SHIV, Griffin *et al.* ont démontré que la progression de la maladie était significativement retardée lorsque les sites de phosphorylation 52 et 56 étaient mutés. Donc, *in vivo*, il semblerait que les fonctions de relâche et de dégradation du récepteur CD4 soient

requis afin que Vpu puisse contribuer de manière optimale à la pathogenèse virale ainsi qu'au développement de la maladie.

Quoique les mécanismes et le rôle de la dégradation de CD4 médiée par Vpu lors de l'infection par la VIH-1 soient mieux compris, les mécanismes sous-jacents l'augmentation de la relâche de particules virales restent à être élucidés. Des études de microscopie électronique réalisées avec des cellules T CD4⁺ infectées ont démontré qu'en absence de Vpu, les particules virales présentaient des morphologies aberrantes (276, 562). En effet, dans ces conditions, une grande proportion des particules virales se retrouvent toujours en association avec la cellule et montrent des différences significatives de taille et de morphologie résultant quelquefois en la formation de particules virales possédant plusieurs capsides. Ainsi, nous avons cherché à déterminer si l'accumulation de particules virales à la surface de la cellule observée en absence de Vpu et la présence de virions possédant plusieurs capsides pouvaient être le résultat direct de ces interactions Env/CD4 qui entraîneraient la fusion des particules virales. D'ailleurs, à cet effet, Sparacio *et al.* avaient démontré qu'il était possible d'obtenir des fusions membranaires inter-virions due à l'incorporation du récepteur dans la particule virale (493). Cependant, nous n'avons pas été en mesure d'établir la contribution de CD4 à la formation de ces agrégats viraux. En effet, dans un système d'expression en transitoire utilisant les cellules 293T, la formation d'agrégats peut être observé que CD4 soit exprimé ou non (Chap. 4; Fig.2). Toutefois, ces résultats ne nous permettent pas d'établir avec certitude que CD4 n'est pas impliqué dans la fusion des virions puisque notre étude utilise essentiellement la microscopie à balayage ce qui nous empêche de discerner l'architecture interne des virions ne nous permettant pas d'observer la présence de virions possédant plusieurs capsides.

Malgré que CD4 ne semble pas impliqué dans l'accumulation de particules virales à la surface de la cellule, nos résultats démontrent que Vpu, par sa fonction de relâche facilitée, contribue à la morphogenèse virale. En effet, en utilisant différents mutants de relâche de Vpu qui maintiennent leur capacité à dégrader CD4, nous avons pu démontrer que l'apparition de ces morphologies était directement liée à la capacité de Vpu à faciliter le bourgeonnement des particules virales (Chap. 4; Fig. 4).

Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'il est tout de même possible d'observer des agrégats viraux et ce, même si Vpu est exprimé. Inversement, dans quelques rares cas, nous avons été en mesure d'observer des particules virales dont la morphologie n'est pas affectée par l'absence d'expression de Vpu. Toutefois, lorsque les phénotypes morphologiques de type sauvage et aberrant sont quantifiés, la corrélation entre la fonction de relâche et l'apparition des agrégats viraux demeure (Chap. 4; Fig. 4). Les cellules 293T constituant un système de surexpression, il est possible que même en présence de Vpu, les sites de bourgeonnement du virus soient saturés occasionnant ainsi la formation d'agrégats similaires à ce qui est observé en absence de Vpu. Par conséquent, ces résultats nous suggèrent que Vpu, par sa fonction de relâche facilitée des virions, influence la morphogenèse du VIH-1 possiblement en empêchant l'accumulation de particules virales au site de bourgeonnement ce qui préviendrait la formation des agrégats observés en absence de Vpu.

Une des hypothèses pouvant expliquer la présence de particules virales de morphologie aberrante à la surface des cellules infectées n'exprimant pas Vpu pourrait être que les virions ne seraient pas relâchés efficacement dû au mauvais ciblage de Gag au site d'assemblage. Il a été démontré que le VIH-1 bourgeonne au niveau des radeaux lipidiques (312, 378). La composition lipidique de ces régions spécialisées de la membrane plasmique étant différente due à leur importante concentration de cholestérol et de sphingolipides, il est possible que les virions ne bourgeonnant pas au niveau de ces régions puissent présenter des densités différentes. Toutefois, il nous a été impossible d'observer de variations de densité des particules virales associées à la surface de la cellule et ce, que les virions soient produits en absence ou en présence de Vpu (Chap. 4; Fig. 5). Donc, en absence de Vpu, le fait que la morphologie des virions soit altérée n'affecte en rien la densité de la particule virale. Toutefois, vu les images obtenues en microscopie électronique, il semble que la taille des particules virales semble différente. Cependant, des études supplémentaires sur gradient de sucrose seraient nécessaires afin de définir dans quelle mesure la taille de ces agrégats est différente de celle des particules virales isolées. Par ailleurs, le fait que la densité des agrégats soit similaire à la densité des

particules isolées n'exclut en rien la possibilité que ce défaut de morphologie soit dû à un mauvais ciblage des composantes structurales du virus à la membrane plasmique au niveau de sites dont le ratio protéo-lipidique serait similaire à ce qui est observé au niveau du virion.

Vpu est capable de faciliter la relâche de Gag de rétrovirus hétérologues dont le virus Visna. Contrairement au VIH, le précurseur Gag de Visna ne possède pas de glycine en N-terminal pouvant servir de cible pour la myristilation (425). Comme Vpu est en mesure de faciliter la relâche des particules de Visna, il est tentant de spéculer que l'effet de Vpu sur la relâche est indépendant du ciblage aux membranes de Gag. Cependant, il a été suggéré qu'en présence de Vpu, Gag était plus efficacement ciblé aux membranes et que ce ciblage à la membrane était dépendant du domaine myristillée de Gag (124). Les études sur l'assemblage tendent à démontrer que Gag s'associe d'abord au niveau du cytoplasme pour ensuite être ciblé à la membrane. Donc, nous pourrions penser que Vpu contribue à l'assemblage plus efficace des intermédiaires de Gag permettant conséquemment un ciblage plus rapide aux membranes ce qui viendrait expliquer comment Vpu pourrait agir sur la relâche de Visna. D'ailleurs, le groupe de Panganiban a pu identifier une protéine cellulaire qui interagit non seulement avec Vpu, mais également avec Gag (UBP: Vpu-binding protein) (60). Leur étude démontre qu'en présence de Vpu, la liaison de Gag à UBP est diminuée (60). De plus, des analyses d'histoimmunochimie ont montré que la co-expression de Vpu entraîne une redistribution de Gag et UBP à la membrane plasmique (226). UBP est une protéine dont la localisation est généralement nucléaire et/ou cytoplasmique où elle se retrouve en association avec le cytosquelette. Dernièrement, Angeletti *et al.* ont pu mettre en évidence qu'il s'agissait d'une cochaperone capable d'affecter l'activité de hsp70 (10). Donc, il est peut-être possible que Vpu contribue à l'assemblage plus efficace des intermédiaires d'assemblage de Gag au niveau du cytoplasme en recrutant UBP.

De manière alternative, Vpu pourrait faciliter le relâchement des particules virales en altérant les propriétés de la membrane plasmique ou encore en recrutant un facteur facilitant la fusion membranaire. À cet effet, il serait peut-être possible de croire que Vpu agisse de manière analogue à l'annexine VII qui est requise lors de la

fusion membranaire lors des phénomènes d'exocytose (78, 107, 314). D'ailleurs, un motif analogue à l'annexine VII a été identifié au niveau de la NC de Gag (495). Il a été démontré que l'annexine VII serait impliquée dans la relâche de vésicules des érythrocytes de manière Ca^{2+} dépendante (446). D'ailleurs, lorsque le flux calcique est affecté, on observe l'aggrégation et la fusion des vésicules à la surface des érythrocytes, phénotype qui n'est pas sans rappeler les aberrations morphologiques observées en absence de Vpu (475). Il serait intéressant de voir comment les flux calciques influent sur le processus de relâche facilité induit par Vpu.

Des études sur la morphogenèse virale ont démontré que le potentiel infectieux des particules virales de morphologies aberrantes était affecté (424). Les virions possédant des noyaux denses dont la morphologie est affectée sont incapables d'initier correctement la rétrotranscription diminuant ainsi leur potentiel infectieux (508). Malgré que la morphologie des virions attachés à la cellule en absence de Vpu semble grandement affectée, leur potentiel infectieux demeure similaire à celui des particules normales observées en présence de Vpu (Chap. 4; Fig. 6). Donc, quoique morphologiquement différents, les virions agrégés à la surface de la cellule observés en absence de Vpu ne semblent toutefois pas présenter de différences quant à leur potentiel infectieux bien que la présence de ces agrégats pourrait éventuellement faciliter l'adsorption des virions sur la cellule cible et ainsi favoriser la transmission de cellules à cellules des virus. En effet, les résultats de spinoculation nous indiquent que malgré que l'infectivité des agrégats soit similaire à celle des particules virales isolées (pour une quantité de RT comparable), l'infection par les agrégats semble facilitée. D'autre part, la plupart des études établissant que la morphologie des particules virales influence le potentiel infectieux des virions montrent des virus dont la capside ne se condense pas de façon adéquate suggérant un défaut de maturation de Pr55^{Gag} . En absence de Vpu, ce phénotype n'est pas observé. En effet, malgré que les virus puissent posséder plusieurs capsides, il apparaît que la maturation de Gag ait eu lieu puisque les capsides sont condensées et apparaissent de forme trapézoïdale (Chap. 4; Fig.1) (276, 562). Donc, les résultats d'infectivité ne sont pas surprenants, d'autant plus que la densité des particules virales n'est pas affectée. Par ailleurs, ces résultats confirment davantage que la présence de ces agrégats n'est pas le résultat

d'un mauvais ciblage au site d'assemblage puisque l'infectivité reste la même. À cet effet, de nombreuses études récentes utilisant la β -cyclodextrine (agent chélateur retirant le cholestérol des membranes) ont montré que l'infectivité des virions dépendait du contenu en cholestérol des particules virales (66, 214). Donc, il est possible de déduire que le contenu lipidique des virions n'est pas touché puisque les aberrations morphologiques observées en absence de Vpu n'affectent pas le potentiel infectieux des particules virales.

Tel que nous l'avons démontré dans le chapitre 3, malgré que le potentiel infectieux des virus Vpu-défectifs soit grandement diminué (Chap.3; Fig. 2) comparativement à celui des virus Vpu⁺, il nous est toutefois impossible d'observer un délai dans l'apparition du point culminant de la production virale lors des études de cinétique de réplication du virus (Chap. 3; Fig. 2 et Chap. 4; Fig. 7A). En effet, si le rôle de Vpu est d'augmenter le potentiel infectieux du VIH-1, il est envisageable de s'attendre à ce qu'il y ait un délai dans la cinétique de réplication entre les virus Vpu⁻ et Vpu⁺. L'absence de délai de réplication obtenu pour les virus défectif pour Vpu peut en partie être expliqué par le fait que la propagation virale se produit principalement par transmission de cellule à cellule plutôt que par infection par des virus libres présents dans les fluides de culture. De ce fait, une étude récente a mis en évidence que des virus défectifs pour l'expression de Vpu se propagent plus efficacement lors de transmissions de cellule à cellule que des virus exprimant un Vpu de type sauvage (223). Dans cette étude, Gumuluru et al. ont observé des morphologies similaires à ce que nous observons *i.e.* qu'en absence de Vpu, il y a formation d'agrégats à la surface des cellules. Les auteurs ont suggéré que ce serait la présence de ces agrégats qui faciliterait la transmission de cellules à cellules dans leur système. Dans ces travaux, nous démontrons qu'en absence de Vpu, la fusion entre les cellules se produit de manière beaucoup plus efficace qu'en présence de Vpu suggérant que l'accumulation de particules virales à la surface de la cellule en absence de Vpu pourrait faciliter la transmission virale de cellules à cellules et contribuer à l'apparition des effets cytopathiques en favorisant la fusion cellulaire. Ainsi, cette transmission facilitée par contact cellulaire pourrait alors compenser en partie pour la perte d'infectivité observée pour les virus Vpu⁻ et conséquemment

entraîner une cinétique de réplication similaire à celle du VIH de type sauvage. Toutefois, des études supplémentaires seront requises afin de définir si l'augmentation des effets cytopathiques en absence de Vpu représente la conséquence directe de l'accumulation de l'Env à la surface de la cellule due à l'entassement de particules virale non relâchées où s'il s'agit d'un phénomène indépendant. En effet, malgré que le mutant de phosphorylation de Vpu semble relâcher normalement, ce mutant ne s'avère pas être en mesure de diminuer l'apparition des effets cytopathiques (174) ce qui suggère possiblement que l'induction de la formation des effets cytopathiques et la relâche facilitée pourraient constituer deux fonctions distinctes de Vpu. Ainsi, le système utilisé dans cette étude représente un moyen intéressant de disséquer ces deux fonctions de Vpu.

Quelques isolats du VIH possèdent des mutations ponctuelles au niveau du codon d'initiation de *vpu* et ce, malgré que le gène de *vpu* demeure intact (99). Une étude visant à déterminer les facteurs viraux impliqués dans le changement de tropisme observé au cours de l'infection par le VIH a permis de démontrer que Vpu serait impliquer dans le passage du phénotype M-tropique vers T-tropique (119). En effet, dans l'étude de Dejucq, la transition du phénotype NSI vers SI s'accompagne par l'apparition d'une mutation ponctuelle au niveau du codon d'initiation de Vpu indiquant possiblement un rôle essentiel de Vpu dans la réplication du virus dans les macrophages. L'élimination du codon d'initiation de *vpu* entraîne une augmentation de l'expression du gène de l'*env* situé en aval. Donc, il est possible que le VIH régule l'expression relative de Vpu et Env dans la cellule infectée afin d'optimiser la propagation virale et diminuer au maximum les effets cytopathiques associés à l'infection. Ainsi, il serait intéressant d'étudier le cadre de lecture de *vpu* chez des patients afin de déterminer si l'apparition *in vivo* des souches SI coïncident avec l'apparition d'une mutation empêchant l'expression de Vpu. D'ailleurs, à présent, la non-progression vers la maladie n'a pu être associée à une perte de fonctionnalité de Vpu (573). Donc, le VIH, en exprimant Vpu, potentialise non seulement l'infectivité des virions relâchés mais retarde également au maximum l'induction des effets cytopathiques et par conséquent la mort cellulaire associée à l'infection.

Études des implications fonctionnelles de la dimérisation de la molécule CD4 lors de l'infection par le VIH-1

La dimérisation est un phénomène couramment décrit pour une grande variété de récepteurs membranaires (300). Au cours de nos travaux, nous avons pu mettre en évidence l'existence de molécules multimériques de CD4 *in vivo*. De plus, nous avons pu montrer que les molécules de CD4 dimériques pouvaient s'associer avec p56^{lck}. (Chap.5; Fig. 1A-B). D'autre part, le fait que CD4 puisse former des dimères en absence de la tyrosine kinase p56^{lck} suggère que la multimérisation de CD4 n'est pas induite par la dimérisation de p56^{lck} puisqu'un mutant de CD4 incapable de lier la tyrosine kinase conserve toujours sa capacité à former des dimères. Toutefois, il n'est pas impossible que la dimérisation de CD4 puisse contribuer à la transphosphorylation de p56^{lck} tel que suggéré par la structure cristallographique de CD4 (556). En fait, ceci est confirmé par le fait que les dimères de CD4 peuvent interagir avec deux molécules de p56^{lck} (Chap.5; Fig. 1A).

La structure cristallographique de CD4 prévoit que CD4 dimérise via le domaine extracellulaire D4 de la molécule. Ces résultats ont été confirmés par une étude de mutagenèse du domaine D4 de CD4 réalisée dans le laboratoire du Dr Sékaly. Les résultats obtenus montrent que les résidus K318 et Q344 sont particulièrement importants pour la dimérisation de CD4. D'ailleurs, ces résidus sont hautement conservés chez au moins 7 espèces dont l'humains, la souris, le rat et le singe (45). De plus, ils ont également pu mettre en évidence que les molécules de CD4 présentes à la surface de la cellule étaient dimériques confirmant ainsi une étude de Lynch *et al.* (323). Au cours de leur travaux, les auteurs ont permis d'établir que la dimérisation de CD4 était requise afin que la molécule puisse jouer ses rôles de co-récepteur et de co-ligand lors de la réponse immunitaire (358).

Quoique le rôle de CD4 lors de l'activation des lymphocytes T semble mieux compris, il n'existe toujours pas d'évidences démontrant l'importance fonctionnelle de la dimérisation de CD4 lors de l'infection par le VIH-1. Des résultats obtenus semblent indiquer que la dimérisation de CD4 pourrait être importante lors de l'infection. En effet, des délais substantiels de réplication sont obtenus lors de

l'infection des lignées exprimant les mutants K318E ou Q344E (Chap. 5; Fig.2). Cependant, ces résultats constituent des données préliminaires puisque la cinétique présentée n'a été pas été reproduite plusieurs fois. Ainsi, ces résultats devront être répétés afin d'éventuellement déterminer comment la dimérisation du récepteur contribue à l'infection du VIH-1. En effet, CD4 représente un des principaux récepteurs du virus. Ainsi, il est possible que la dimérisation de CD4 puisse être importante lors de la reconnaissance de l'Env virale. Étant donné que l'entrée représente un processus multiphasique impliquant de nombreux intermédiaires suite à la reconnaissance initiale du récepteur, il serait intéressant de voir comment la dimérisation de CD4 affecte entre autre, l'exposition de la boucle V3 de l'Env afin de permettre l'interaction subséquente avec les co-récepteurs. Par ailleurs, des études ont démontré que CD4, via son domaine intracytoplasmique, pouvait inhiber l'activité transcriptionnelle du LTR du VIH-1(30, 522). Étant donné le rôle de la dimérisation du récepteur lors de l'activation des lymphocytes T, tel que démontré par Moldovan *et al.*, il serait intéressant de comprendre comment la perte de dimérisation de CD4 pourrait éventuellement affecter la transmission de signaux inhibant l'activité du LTR du VIH. Clairement, des études supplémentaires sont requises afin de mieux comprendre comment la dimérisation de CD4 pourrait contribuer à l'infection par le VIH-1. Par conséquent, ces études pourraient éventuellement contribuer au développement d'approches pratiques permettant de mieux contrôler la réplication du VIH-I et ses conséquences pathogéniques.

CONCLUSION

Le VIH est l'agent étiologique du SIDA. La progression rapide de la maladie dépend d'une multitude de facteurs d'origine autant virale que cellulaire et de leur interaction. Certains facteurs de l'hôte peuvent en partie expliquer les différences de susceptibilité à l'infection virale ainsi que ses conséquences pathogéniques tandis que les variations du virus peuvent rendre compte des variations de virulence et de progression de la maladie.

Outre les gènes *gag*, *pol* et *env* normalement retrouvés chez tous les rétrovirus, le VIH possède plusieurs cadres de lecture supplémentaires codant pour les gènes accessoires *vif*, *vpr/vpx*, *vpu* et *nef*. Quoique non essentielles à la réplication du virus *in vitro*, les connaissances actuelles relatives au rôle de ces protéines ont permis de mettre en lumière leur importance dans la pathogenèse virale et la réplication du VIH *in vivo*. En effet, *in vivo* les protéines accessoires contribuent de manière non-négligeable tant à la propagation virale qu'à l'induction de la maladie. Ainsi, nous avons pu démontrer que Vpu, par ses deux fonctions (induction de la dégradation du récepteur CD4 et facilitation de la relâche des virus) contribuait de manière significative à la réplication virale. En effet, nous avons pu démontrer d'une part que Vpu contribue à l'infectivité virale en diminuant l'incorporation de CD4 dans les virions. De plus, nous avons démontré que Vpu facilite la relâche virale en contribuant à la morphogenèse virale. Donc, globalement, les travaux présentés dans ce document nous incitent à croire que le rôle de Vpu lors de l'infection par le VIH-1 serait de relâcher efficacement des particules virales pleinement infectieuses facilitant ainsi non seulement la propagation virale mais également la transmission horizontale du virus contribuant ainsi à la pathogenèse du VIH-1. Toutefois, quoique les mécanismes sous-jacents à la diminution de l'expression de surface de CD4 soient mieux compris, clairement, des études supplémentaires sont requises afin de mieux définir comment Vpu contribue à l'augmentation de la relâche des virus de la cellule infectée. Par conséquent, une meilleure compréhension du rôle de Vpu ainsi que des autres protéines accessoires du virus est essentielle afin de mieux comprendre et ainsi développer des stratégies nous permettant de mieux contrôler la réplication du VIH-1.

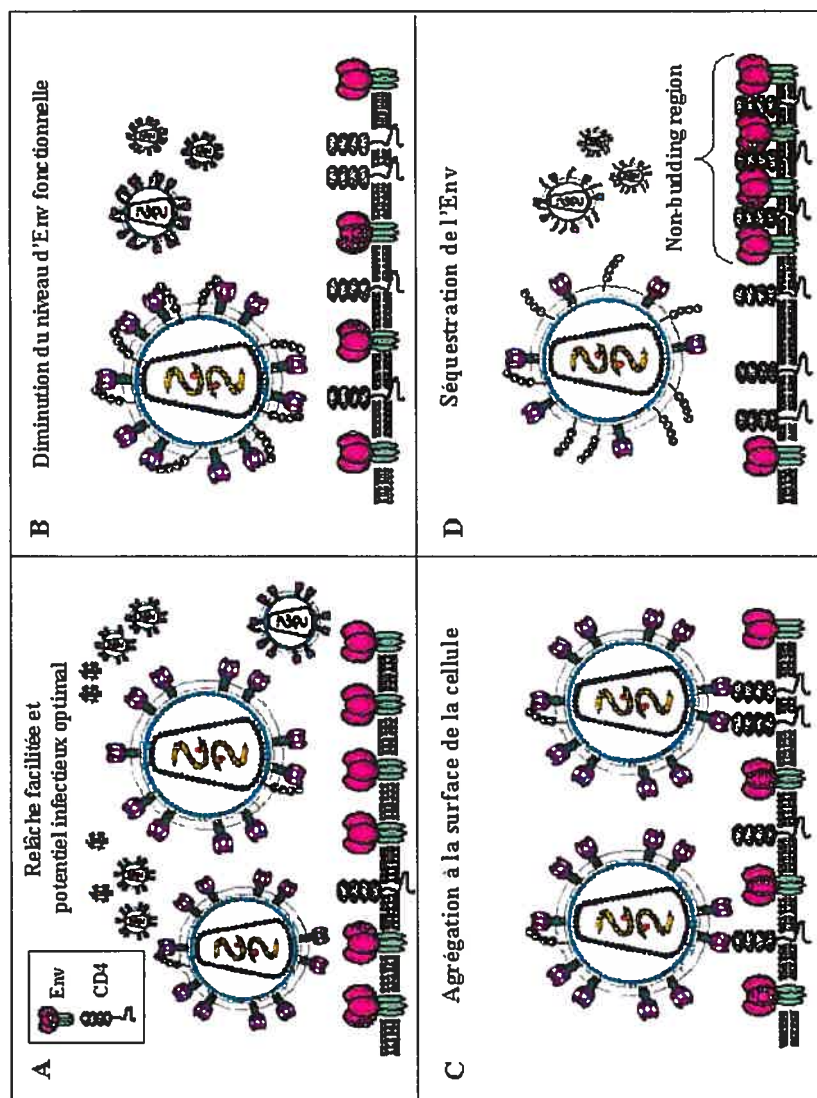


Figure 1. Différents modèles expliquant comment le récepteur CD4 contribue à l'infectivité du VIH-1

A. Pendant la réplication du VIH-1, Vpu et Nef contribuent à la diminution de l'expression de surface de CD4. Conséquemment, des particules virales pleinement infectieuses sont efficacement relâchées de la cellule infectée. B. En absence de Vpu, le niveau de CD4 exprimé à la surface de la cellule est élevé ce qui entraîne son incorporation aux virions bourgeonnants. Conséquemment, le potentiel infectieux des virions est affecté par un mécanisme impliquant la formation de complexes de haute affinité CD4/gp120 à la surface du virion. C. En absence de Vpu et/ou Nef, le niveau de CD4 exprimé à la surface de la cellule est élevé. Le modèle de l'agrégation suggère que les molécules de CD4 présentes à la surface de la cellule préviennent la relâche efficace des virions en capturant les virus bourgeonnants à la surface de la cellule. D. En absence de Nef, les fortes concentrations de CD4 présentes à la surface entraînent une baisse considérable du potentiel infectieux des virions en induisant la séquestration de l'Env dans des régions de la membranes plasmiques situées hors des sites d'assemblage. Quoique CD4 soit incorporé aux virions, le récepteur réussit également à bloquer efficacement l'incorporation de l'Env aux particules virales bourgeonnantes.

Chapitre 7

Bibliographie

1. Abacioglu, Y. H., T. R. Fouts, J. D. Laman, E. Claassen, S. H. Pincus, J. P. Moore, C. A. Roby, R. Kamin-Lewis, and G. K. Lewis. 1994. Epitope mapping and topology of baculovirus-expressed HIV-1 gp160 determined with a panel of murine monoclonal antibodies. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:371-81.
2. Adachi, A., H. E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson, and M. A. Martin. 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* **59**:284-91.
3. Adam, S. A., and L. Gerace. 1991. Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import. *Cell* **66**:837-47.
4. Aguilar-Cordova, E., J. Chinen, L. Donehower, D. E. Lewis, and J. W. Belmont. 1994. A sensitive reporter cell line for HIV-1 tat activity, HIV-1 inhibitors, and T cell activation effects. *AIDS Research & Human Retroviruses*. **10**:295-301.
5. Aiken, C., J. Konner, N. R. Landou, M. E. Lenburg, and D. Trono. 1994. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*. **76**:853-64.
6. Aiken, C., and D. Trono. 1995. Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *J. Virol.* **69**:5048-56.
7. Akari, H., S. Bour, S. Kao, A. Adachi, and K. Strebel. 2001. The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors. *J. Exp. Med.* **194**:1299-311.
8. Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**:1955-8.
9. Allan, J. S., J. E. Coligan, F. Barin, M. F. McLane, J. G. Sodroski, C. A. Rosen, W. A. Haseltine, T. H. Lee, and M. Essex. 1985. Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science* **228**:1091-4.
10. Angeletti, P. C., D. Walker, and A. T. Panganiban. 2002. Small glutamine-rich protein/viral protein U-binding protein is a novel cochaperone that affects heat shock protein 70 activity. *Cell Stress Chaperones* **7**:258-68.
11. Arganaraz, E. R., M. Schindler, F. Kirchhoff, M. J. Cortes, and J. Lama. 2003. Enhanced CD4 down-modulation by late-stage HIV-1 nef alleles is associated with increased Env incorporation and viral replication. *J. Biol. Chem.* **epub**.
12. Arrigo, S. J., and I. S. Chen. 1991. Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs. *Genes Dev.* **5**:808-19.
13. Arthos, J., K. C. Deen, M. A. Chaikin, J. A. Fornwald, G. Sathe, Q. J. Sattentau, P. R. Clapham, R. A. Weiss, J. S. McDougal, C. Pietropaolo, and

- al. 1989. Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV. *Cell* **57**:469-81.
14. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. G. Smith, and K. Struhl. 1991. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing associates and John Wiley & sons, New-York.
15. Ayyavoo, V., A. Mahboubi, S. Mahalingam, R. Ramalingam, S. Kudchodkar, W. V. Williams, D. R. Green, and D. B. Weiner. 1997. HIV-1 Vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor kappa B. *Nat Med* **3**:1117-23.
16. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser. 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* **55**:97-179.
17. Baldwin, C. E., R. W. Sanders, and B. Berkhout. 2003. Inhibiting HIV-1 Entry with Fusion Inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **10**:1633-42.
18. Baltimore, D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**:1209-11.
19. Barat, C., V. Lullien, O. Schatz, G. Keith, M. T. Nugeyre, F. Gruninger-Leitch, F. Barre-Sinoussi, S. F. LeGrice, and J. L. Darlix. 1989. HIV-1 reverse transcriptase specifically interacts with the anticodon domain of its cognate primer tRNA. *EMBO.* **8**:3279-85.
20. Barlow, K. L., A. O. Ajao, and J. P. Clewley. 2003. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus (SIVmonNG1) genome sequence from a mona monkey (*Cercopithecus mona*). *J. Virol.* **77**:6879-88.
21. Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-71.
22. Bathurst, I. C., N. Chester, H. L. Gibson, A. F. Dennis, K. S. Steimer, and P. J. Barr. 1989. N myristylation of the human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein precursor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.* **63**:3176-9.
23. Ben-Artzi, H., J. Shemesh, E. Zeelon, B. Amit, L. Kleiman, M. Gorecki, and A. Panet. 1996. Molecular analysis of the second template switch during reverse transcription of the HIV RNA template. *Biochemistry* **35**:10549-57.
24. Benson, R. E., A. Sanfridson, J. S. Ottinger, C. Doyle, and B. R. Cullen. 1993. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral superinfection. *J. Exp. Med.* **177**:1561-6.
25. Berkhout, B., R. H. Silverman, and K. T. Jeang. 1989. Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* **59**:273-82.
26. Berkowitz, R., J. Fisher, and S. P. Goff. 1996. RNA packaging. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **214**:177-218.
27. Berkowitz, R. D., M. L. Hammarskjold, C. Helga-Maria, D. Rekosh, and S. P. Goff. 1995. 5' regions of HIV-1 RNAs are not sufficient for encapsidation: implications for the HIV-1 packaging signal. *Virology* **212**:718-23.

28. Berthet-Colominas, C., S. Monaco, A. Novelli, G. Sibai, F. Mallet, and S. Cusack. 1999. Head-to-tail dimers and interdomain flexibility revealed by the crystal structure of HIV-1 capsid protein (p24) complexed with a monoclonal antibody Fab. *EMBO* **18**:1124-36.
29. Berube, P., B. Barbeau, R. Cantin, R. Sekaly, and M. Tremblay. 1996. Repression of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat-driven gene expression by binding of the virus to its primary cellular receptor, the CD4 molecule. *J. Virol.* **70**:4009-16.
30. Berube, P., B. Barbeau, R. Cantin, R. P. Sekaly, and M. Tremblay. 1996. Repression of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat-driven gene expression by binding of the virus to its primary cellular receptor, the CD4 molecule. *J. Virol.* **70**:4009-16.
31. Blanc, D., C. Patience, T. F. Schulz, R. Weiss, and B. Spire. 1993. Transcomplementation of VIF- HIV-1 mutants in CEM cells suggests that VIF affects late steps of the viral life cycle. *Virology* **193**:186-92.
32. Bleul, C. C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, and T. A. Springer. 1996. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* **382**:829-33.
33. Bleul, C. C., L. Wu, J. A. Hoxie, T. A. Springer, and C. R. Mackay. 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *PNAS* **94**:1925-30.
34. Bogerd, H. P., A. Echarri, T. M. Ross, and B. R. Cullen. 1998. Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to Crm1. *J. Virol.* **72**:8627-35.
35. Borman, A., C. Quillent, P. Charneau, C. Dauguet, and F. Clavel. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Vif- mutant particles from restrictive cells: role of Vif in correct particle assembly and infectivity. *J. Virol.* **69**:2058-67.
36. Borsetti, A., A. Ohagen, and H. G. Gottlinger. 1998. The C-terminal half of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is sufficient for efficient particle assembly. *J. Virol.* **72**:9313-7.
37. Boshart, M., L. Gissmann, H. Ikenberg, A. Kleinheinz, W. Scheurlen, and H. zur Hausen. 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO* **3**:1151-7.
38. Bouamr, F., S. Scarlata, and C. Carter. 2003. Role of myristylation in HIV-1 Gag assembly. *Biochemistry* **42**:6408-17.
39. Bouhamdan, M., S. Benichou, F. Rey, J. M. Navarro, I. Agostini, B. Spire, J. Camonis, G. Slupphaug, R. Vigne, R. Benarous, and J. Sire. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein binds to the uracil DNA glycosylase DNA repair enzyme. *J. Virol.* **70**:697-704.
40. Bour, S., C. Perrin, H. Akari, and K. Strebel. 2001. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein inhibits NF-kappa B activation

- by interfering with beta TrCP-mediated degradation of Ikappa B. *J. Biol. Chem.* **276**:15920-8.
41. Bour, S., C. Perrin, and K. Strebel. 1999. Cell surface CD4 inhibits HIV-1 particle release by interfering with Vpu activity. *J. Biol. Chem.* **274**:33800-6.
 42. Bour, S., U. Schubert, K. Peden, and K. Strebel. 1996. The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor. *J. Virol.* **70**:8285-8300.
 43. Bour, S., U. Schubert, and K. Strebel. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domains of CD4: implication for the mechanism of degradation. *J. Virol.* **69**:1510-20.
 44. Bour, S., and K. Strebel. 1996. The Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 2 ENvelope Protein Is a Functional Complement to HIV type 1 Vpu That Enhances Particle Release of Heterologous Retroviruses. *J. Virol.* **70**:8285-300.
 45. Brady, R. L., and A. N. Barclay. 1996. The structure of CD4. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **205**:1-18.
 46. Brady, R. L., E. J. Dodson, G. G. Dodson, G. Lange, S. J. Davis, A. F. Williams, and A. N. Barclay. 1993. Crystal structure of domains 3 and 4 of rat CD4: relation to the NH2-terminal domains. *Science* **260**:979-83.
 47. Brady, R. L., G. Lange, and A. N. Barclay. 1993. Structural studies of CD4: crystal structure of domains 3 and 4 and their implication for the overall receptor structure. *Biochem. Soc. Trans.* **21**:958-63.
 48. Brelot, A., N. Heveker, M. Montes, and M. Alizon. 2000. Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J. Biol. Chem.* **275**:23736-44.
 49. Brin, E., J. Yi, A. M. Skalka, and J. Leis. 2000. Modeling the Late Steps in HIV-1 Retroviral Integrase-catalyzed DNA Integration. *J. Biol. Chem.* **275**:39287-295.
 50. Brown, D. A., and J. K. Rose. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**:533-44.
 51. Brown, P. O., B. Bowerman, H. E. Varmus, and J. M. Bishop. 1989. Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *PNAS* **86**:2525-9.
 52. Bryant, M. L., R. O. Heuckeroth, J. T. Kimata, L. Ratner, and J. I. Gordon. 1989. Replication of human immunodeficiency virus 1 and Moloney murine leukemia virus is inhibited by different heteroatom-containing analogs of myristic acid. *PNAS* **86**:8655-9.
 53. Buchow, H. D., E. Tschachler, R. C. Gallo, and M. Reitz, Jr. 1989. HIV-I replication requires an intact integrase reading frame. *Haematol. Blood. Transfus.* **32**:402-5.
 54. Bukrinsky, M. I., and O. K. Haffar. 1999. HIV-1 nuclear import: in search of a leader. *Front. Biosci.* **4**:D772-81.
 55. Bukrinsky, M. I., S. Haggerty, M. P. Dempsey, N. Sharova, A. Adzhubel, L. Spitz, P. Lewis, D. Goldfarb, M. Emerman, and M. Stevenson. 1993. A

- nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**:666-9.
56. Bukrinsky, M. I., N. Sharova, M. P. Dempsey, T. L. Stanwick, A. G. Bukrinskaya, S. Haggerty, and M. Stevenson. 1992. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *PNAS* **89**:6580-4.
 57. Bukrinsky, M. I., N. Sharova, T. L. McDonald, T. Pushkarskaya, W. G. Tarpley, and M. Stevenson. 1993. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *PNAS* **90**:6125-9.
 58. Burniston, M. T., A. Cimarelli, J. Colgan, S. P. Curtis, and J. Luban. 1999. Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein multimerization requires the nucleocapsid domain and RNA and is promoted by the capsid-dimer interface and the basic region of matrix protein. *J. Virol.* **73**:8527-40.
 59. Bushman, F., and R. Craigie. 1991. Activities of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Integration Protein In vitro: Specific Cleavage and Integration of HIV DNA. *PNAS* **88**:1339-43.
 60. Callahan, M. A., M. A. Handley, Y. H. Lee, Talbot, K.J., J. W. Harper, and A. T. Panganiban. 1998. Functional interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vpu and Gag with a novel member of the tetratricopeptide repeat protein family. *J. Virol.* **72**:5189-97.
 61. Camaur, D., and D. Trono. 1996. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J. Virol.* **70**:6106-11.
 62. Cammarota, G., A. Scheirle, B. Takacs, D. M. Doran, R. Knorr, W. Bannwarth, J. Guardiola, and F. Sinigaglia. 1992. Identification of a CD4 binding site on the beta 2 domain of HLA-DR molecules. *Nature* **356**:799-801.
 63. Campbell, S., R. J. Fisher, E. M. Towler, S. Fox, H. J. Issaq, T. Wolfe, L. R. Phillips, and A. Rein. 2001. Modulation of HIV-like particle assembly in vitro by inositol phosphates. *PNAS* **98**:10875-9.
 64. Campbell, S., and A. Rein. 1999. In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain. *J. Virol.* **73**:2270-9.
 65. Campbell, S. M., S. M. Crowe, and J. Mak. 2001. Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J Clin Virol* **22**:217-27.
 66. Campbell, S. M., S. M. Crowe, and J. Mak. 2002. Virion-associated cholesterol is critical for the maintenance of HIV-1 structure and infectivity. *AIDS* **16**:2253-61.
 67. Campos-Olivas, R., J. L. Newman, and M. F. Summers. 2000. Solution structure and dynamics of the Rous sarcoma virus capsid protein and comparison with capsid proteins of other retroviruses. *J. Mol. Biol.* **296**:633-49.
 68. Cantin, R., J. F. Fortin, G. Lamontagne, and M. Tremblay. 1997. The acquisition of host-derived major histocompatibility complex class II glycoproteins by human immunodeficiency virus type 1 accelerates the

- process of virus entry and infection in human T-lymphoid cells. *Blood* **90**:1091-100.
69. Cantin, R., J. F. Fortin, G. Lamontagne, and M. Tremblay. 1997. The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity. *J. Virol.* **71**:1922-30.
 70. Casella, C. R., E. L. Rapaport, and T. Finkel. 1999. Vpu increases susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 infected cells to Fas killing. *J. Virol.* **73**:92-100.
 71. CDC. 1982. Epidemiologic aspects of the current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections. *N. Engl. J. Med.* **306**:248-52.
 72. CDC. 1981. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **30**:305-8.
 73. CDC. 1981. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **30**:250-2.
 74. CDC. 1982. Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **31**:652-4.
 75. CDC. 1982. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS) among patients with hemophilia A. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **31**:644-6, 652.
 76. CDC. 1982. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **31**:507-8, 513-4.
 77. Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim. 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**:263-73.
 78. Chander, A., and R. D. Wu. 1991. In vitro fusion of lung lamellar bodies and plasma membrane is augmented by lung synexin. *Biochim. Biophys. Acta* **1086**:157-66.
 79. Charneau, P., M. Alizon, and F. Clavel. 1992. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J. Virol.* **66**:2814-20.
 80. Charneau, P., and F. Clavel. 1991. A single-stranded gap in human immunodeficiency virus unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract. *J. Virol.* **65**:2415-21.
 81. Chazal, N., B. Gay, C. Carriere, J. Tournier, and P. Boulanger. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 MA deletion mutants expressed in baculovirus-infected cells: cis and trans effects on the Gag precursor assembly pathway. *J. Virol.* **69**:365-75.
 82. Chen, B. K., R. T. Gandhi, and D. Baltimore. 1996. CD4 down-modulation during infection of human T cells with human immunodeficiency virus type 1 involves independent activities of vpu, env, and nef. *J. Virol.* **70**: 6044-53.
 83. Chen, C. A., and H. Okayama. 1988. Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* **6**:632-8.
 84. Choe, H., M. Farzan, M. Konkel, K. Martin, Y. Sun, L. Marcon, M. Cayabyab, M. Berman, M. E. Dorf, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski. 1998. The Orphan Seven-Transmembrane Receptor Apj Supports the Entry of

- Primary T-Cell-Line-Tropic and Dualtropic Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* **72**:6113-18.
85. Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, C. R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski. 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**:1135-48.
 86. Chowdhury, I., W. Chao, M. Potash, P. Sova, H. Gendelman, and D. Volsky. 1996. vif-negative human immunodeficiency virus type 1 persistently replicates in primary macrophages, producing attenuated progeny virus. *J. Virol.* **70**:5336-45.
 87. Chowers, M. Y., M. W. Pandori, C. A. Spina, D. D. Richman, and J. C. Guatelli. 1995. The growth advantage conferred by HIV-1 nef is determined at the level of viral DNA formation and is independent of CD4 downregulation. *Virology* **212**: 451-7.
 88. Chowers, M. Y., C. A. Spina, T. J. Kwok, N. J. Fitch, D. D. Richman, and J. C. Guatelli. 1994. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J. Virol.* **68**:2906-14.
 89. Chun, T. W., R. T. Davey, Jr., D. Engel, H. C. Lane, and A. S. Fauci. 1999. Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature* **401**:874-5.
 90. Chun, T. W., and A. S. Fauci. 1999. Latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus. *PNAS* **96**:10958-61.
 91. Clapham, P., A. McKnight, G. Simmons, and R. Weiss. 1993. Is CD4 sufficient for HIV entry? Cell surface molecules involved in HIV infection. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **342**:67-73.
 92. Clark, S. J., M. S. Saag, W. D. Decker, S. Campbell-Hill, J. L. Roberson, P. J. Veldkamp, J. C. Kappes, B. H. Hahn, and G. M. Shaw. 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* **324**:954-60.
 93. Clavel, F., M. Guyader, D. Guetard, M. Salle, L. Montagnier, and M. Alizon. 1986. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* **324**:691-5.
 94. Coady, M. J., N. Daniel, E. Tiganos, B. Allain, J. Friborg, J.-Y. Lapointe, and E. A. Cohen. 1997. Effects of Vpu expression on *Xenopus* Oocyte membrane conductance. *Virology* **244**:39-49.
 95. Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and et al. 1986. Human immunodeficiency viruses. *Science* **232**:697.
 96. Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and et al. 1986. What to call the AIDS virus? *Nature* **321**:10.
 97. Coffin, J. M. 1992. Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **176**:143-64.
 98. Cohen, E. A., G. Dehni, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1990. Human immunodeficiency virus *vpr* product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* **64**:3097-99.

99. Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1988. Identification of a protein encoded by the *vpu* gene of HIV-1. *Nature* **334**:532-34.
100. Cohen, G. B., R. T. Gandhi, D. M. Davis, O. Mandelboim, B. K. Chen, J. L. Strominger, and D. Baltimore. 1999. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* **10**:661-71.
101. Collins, K. L., B. K. Chen, S. A. Kalams, B. D. Walker, and D. Baltimore. 1998. HIV-1 Nef protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **391**:397-401.
102. Combadiere, C., S. Ahuja, H. Tiffany, and P. Murphy. 1996. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES. *J. Leukoc. Biol.* **60**:147-52.
103. Cooper, D. A., J. Gold, P. Maclean, B. Donovan, R. Finlayson, T. G. Barnes, H. M. Michelmore, P. Brooke, and R. Penny. 1985. Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* **1**:537-40.
104. Cortes, M. J., F. Wong-Staal, and J. Lama. 2002. Cell surface CD4 interferes with the infectivity of HIV-1 particles released from T cells. *J. Biol. Chem.* **277**:1770-9.
105. Cosson, P. 1996. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *EMBO* **15**:5783-8.
106. Courgnaud, V., M. Salemi, X. Pourrut, E. Mpoudi-Ngole, B. Abela, P. Auzel, F. Bibollet-Ruche, B. Hahn, A. M. Vandamme, E. Delaporte, and M. Peeters. 2002. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus with a *vpu* gene from greater spot-nosed monkeys (*Cercopithecus nictitans*) provides new insights into simian/human immunodeficiency virus phylogeny. *J. Virol.* **76**:8298-309.
107. Creutz, C. E. 1992. The annexins and exocytosis. *Science* **258**:924-31.
108. Crise, B., L. Buonocore, and J. K. Rose. 1990. CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. *J. Virol.* **64**:5585-93.
109. Cullen, B. R. 1998. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* **93**:685-92.
110. Cullen, B. R. 1994. The Role of Nef in the Replication Cycle of the Human and Simian Immunodeficiency Viruses. *Virology* **205**:1-6.
111. Dahmus, M. E. 1995. Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1261**:171-82.
112. Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-7.
113. Dannull, J., A. Surovoy, G. Jung, and K. Moelling. 1994. Specific binding of HIV-1 nucleocapsid protein to PSI RNA in vitro requires N-terminal zinc finger and flanking basic amino acid residues. *EMBO* **13**:1525-33.

114. Das, A. T., and B. Berkhout. 1995. Efficient extension of a misaligned tRNA-primer during replication of the HIV-1 retrovirus. *Nucleic Acids Res.* **23**:1319-26.
115. Dayton, A. I., J. G. Sodroski, C. A. Rosen, W. C. Goh, and W. A. Haseltine. 1986. The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* **44**:941-7.
116. Deacon, N. J., A. Tsykin, A. Solomon, K. Smith, M. Ludford-Menting, D. J. Hooker, D. A. McPhee, A. L. Greenway, A. Ellett, and a. Chatfield et. 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **270**:988-91.
117. Dean, M., M. Carrington, C. Winkler, G. A. Huttley, M. W. Smith, R. Allikmets, J. J. Goedert, S. P. Buchbinder, E. Vittinghoff, E. Gomperts, S. Donfield, D. Vlahov, R. Kaslow, A. Saah, C. Rinaldo, R. Detels, and S. J. O'Brien. 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* **273**:1856-62.
118. Dedera, D., W. Hu, N. Vander Heyden, and L. Ratner. 1989. Viral protein R of human immunodeficiency virus types 1 and 2 is dispensable for replication and cytopathogenicity in lymphoid cells. *J. Virol.* **63**:3205-8.
119. Dejucq, N. 2000. HIV-1 replication in CD4+ T cell lines: the effects of adaptation on co-receptor use, tropism, and accessory gene function. *J. Leukoc. Biol.* **68**:331-7.
120. Del Real, G., S. Jimenez-Baranda, R. A. Lacalle, E. Mira, P. Lucas, C. Gomez-Mouton, A. C. Carrera, A. C. Martinez, and S. Manes. 2002. Blocking of HIV-1 infection by targeting CD4 to nonraft membrane domains. *J. Exp. Med.* **196**:293-301.
121. DeLuca, C., H. Kwon, R. Lin, M. Wainberg, and J. Hiscott. 1999. NF-kappaB activation and HIV-1 induced apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **10**:235-53.
122. Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**: 661-6.
123. Deng, H. K., D. Unutmaz, V. N. KewalRamani, and D. R. Littman. 1997. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* **388**:296-300.
124. Deora, A., P. Spearman, and L. Ratner. 2000. The N-terminal matrix domain of HIV-1 Gag is sufficient but not necessary for viral protein U-mediated enhancement of particle release through a membrane-targeting mechanism. *Virology* **269**:305-12.
125. Depienne, C., P. Roques, C. Creminon, L. Fritsch, R. Casseron, D. Dormont, C. Dargemont, and S. Benichou. 2000. Cellular distribution and karyophilic properties of matrix, integrase, and Vpr proteins from the human and simian immunodeficiency viruses. *Exp. Cell. Res.* **260**:387-95.

126. Deschambeault, J., J. F. Lalonde, R. Lodge, E. A. Cohen, and G. Lemay. 1999. Polarized HIV budding in lymphocytes involves a tyrosine-based signal and favor cell-to-cell transmission. *J. Virol.* **73**:5010-17.
127. Desrosiers, R. C., J. D. Lifson, J. S. Gibbs, S. C. Czajak, A. Y. Howe, L. O. Arthur, and R. P. Johnson. 1998. Identification of highly attenuated mutants of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **72**:1431-7.
128. di Marzo Veronese, F., T. D. Copeland, A. L. DeVico, R. Rahman, S. Oroszlan, R. C. Gallo, and M. G. Sarngadharan. 1986. Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science* **231**:1289-91.
129. Dickey, C., U. Ziegner, M. G. Agadjanyan, V. Srikantan, Y. Refaeli, A. Prabhu, A. Sato, W. V. Williams, D. B. Weiner, and K. E. Ugen. 2000. Murine monoclonal antibodies biologically active against the amino region of HIV-1 gp120: isolation and characterization. *DNA Cell. Biol.* **19**:243-52.
130. Dimitrov, D. S. 2000. Cell biology of virus entry. *Cell* **101**:697-702.
131. Dinman, J. D., M. J. Ruiz-Echevarria, and S. W. Peltz. 1998. Translating old drugs into new treatments: ribosomal frameshifting as a target for antiviral agents. *Trends Biotechnol.* **16**:190-6.
132. Doranz, B. J., M. J. Orsini, J. D. Turner, T. L. Hoffman, J. F. Berson, J. A. Hoxie, S. C. Peiper, L. F. Brass, and R. W. Doms. 1999. Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions. *J. Virol.* **73**:2752-61.
133. Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman, and R. W. Doms. 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**:1149-58.
134. Dorfman, T., A. Bukovsky, A. Ohagen, S. Hoglund, and H. G. Gottlinger. 1994. Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **68**:8180-7.
135. Dorfman, T., F. Mammano, W. A. Haseltine, and H. G. Gottlinger. 1994. Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **68**:1689-96.
136. Doyle, C., and J. L. Strominger. 1987. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* **330**:256-9.
137. Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**:667-73.
138. DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller, and M. P. Calos. 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* **7**:379-87.
139. Earl, P. L., and B. Moss. 1993. Mutational analysis of the assembly domain of the HIV-1 envelope glycoprotein. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**:589-94.
140. Ebbets-Reed, D., S. Scarlata, and C. A. Carter. 1996. The major homology region of the HIV-1 gag precursor influences membrane affinity. *Biochemistry* **35**:14268-75.

141. Ehrlich, L. S., B. E. Agresta, and C. A. Carter. 1992. Assembly of recombinant human immunodeficiency virus type 1 capsid protein in vitro. *J. Virol.* **66**:4874-83.
142. Ellison, V., and P. O. Brown. 1994. A stable complex between integrase and viral DNA ends mediates human immunodeficiency virus integration in vitro. *PNAS* **91**:7316-20.
143. Embretson, J., M. Zupancic, J. L. Ribas, A. Burke, P. Racz, K. Tenner-Racz, and A. T. Haase. 1993. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* **362**:359-62.
144. Emerman, M., and M. H. Malim. 1998. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* **280**:1880-4.
145. Endres, M. J., P. R. Clapham, M. Marsh, M. Ahuja, J. D. Turner, A. McKnight, J. F. Thomas, B. Stoeckenau-Haggarty, S. Choe, P. J. Vance, T. N. Wells, C. A. Power, S. S. Sutterwala, R. W. Doms, N. R. Landau, and J. A. Hoxie. 1996. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* **87**:745-56.
146. Engelman, A., and R. Craigie. 1992. Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. *J. Virol.* **66**:6361-9.
147. Engelman, A., A. B. Hickman, and R. Craigie. 1994. The core and carboxyl-terminal domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 each contribute to nonspecific DNA binding. *J. Virol.* **68**:5911-7.
148. Ewart, G. D., T. Sutherland, P. W. Gage, and G. B. Cox. 1996. The Vpu Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Forms Cation-Selective Ion Channels. *J. Virol.* **70**:7108-15.
149. Facke, M., A. Janetzko, R. L. Shoeman, and H. G. Krausslich. 1993. A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects virus particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **67**:4972-80.
150. Fackler, O. T., N. Kienzle, E. Kremmer, A. Boese, B. Schramm, T. Klimkait, C. Kucherer, and N. Mueller-Lantzsch. 1997. Association of human immunodeficiency virus Nef protein with actin is myristoylation dependent and influences its subcellular localization. *Eur. J. Biochem./FEBS* **247**:843-51.
151. Fackler, O. T., W. Luo, M. Geyer, A. S. Alberts, and B. M. Peterlin. 1999. Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions. *Mol. Cell* **3**:729-39.
152. Fackler, O. T., and B. M. Peterlin. 2000. Endocytic entry of HIV-1. *Curr. Biol.* **10**:1005-8.
153. Fais, S., M. R. Capobianchi, I. Abbate, C. Castilletti, M. Gentile, P. Cordiali Fei, F. Ameglio, and F. Dianzani. 1995. Unidirectional budding of HIV-1 at the site of cell-to-cell contact is associated with co-polarization of intercellular adhesion molecules and HIV-1 viral matrix protein. *AIDS* **9**:329-35.

154. Farabaugh, P. J. 1996. Programmed translational frameshifting. *Annu. Rev. Genet.* **30**:507-28.
155. Fassati, A., and S. P. Goff. 2001. Characterization of Intracellular Reverse Transcription Complexes of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* **75**:3626-35.
156. Fauci, A. S. 1999. The AIDS epidemic--considerations for the 21st century. *N. Engl. J. Med.* **341**:1046-50.
157. Fauci, A. S. 1988. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* **239**:617-22.
158. Fauci, A. S. 1993. Immunopathogenesis of HIV infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **6**:655-62.
159. Fauci, A. S. 1993. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* **262**:1011-8.
160. Federeau, T., U. Schubert, J. Flossdorf, P. Henklein, D. Schomburg, and V. Wray. 1996. Solution structure of the cytoplasmic domain of the human immunodeficiency virus type 1 encoded virus protein U (Vpu). *Int. J. Peptide Res.* **47**:297-310.
161. Feng, Y. X., T. D. Copeland, L. E. Henderson, R. J. Gorelick, W. J. Bosche, J. G. Levin, and A. Rein. 1996. HIV-1 nucleocapsid protein induces "maturation" of dimeric retroviral RNA in vitro. *PNAS* **93**:7577-81.
162. Finston, W. I., and J. J. Champoux. 1984. RNA-primed initiation of Moloney murine leukemia virus plus strands by reverse transcriptase in vitro. *J. Virol.* **51**:26-33.
163. Fisher, A. G., B. Ensoli, L. Ivanoff, M. Chamberlain, S. Petteway, L. Ratner, R. C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1987. The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science* **237**:888-93.
164. Fisher, A. G., M. B. Feinberg, S. F. Josephs, M. E. Harper, L. M. Marselle, G. Reyes, M. A. Gonda, A. Aldovini, C. Debouk, R. C. Gallo, and et al. 1986. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* **320**:367-71.
165. Fleury, S., D. Lamarre, S. Meloche, S. E. Ryu, C. Cantin, W. A. Hendrickson, and R. P. Sekaly. 1991. Mutational analysis of the interaction between CD4 and class II MHC: class II antigens contact CD4 on a surface opposite the gp120-binding site. *Cell* **66**:1037-49.
166. Folks, T., D. M. Powell, M. M. Lightfoote, S. Benn, M. A. Martin, and A. S. Fauci. 1986. Induction of HTLV-III/LAV from a nonvirus-producing T-cell line: implications for latency. *Science* **231**:600-2.
167. Forshey, B. M., U. von Schwedler, W. I. Sundquist, and C. Aiken. 2002. Formation of a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Core of Optimal Stability Is Crucial for Viral Replication. *J. Virol.* **76**:5667-77.
168. Fortin, J.-F., R. Cantin, L. G., and M. Tremblay. 1997. Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J. Virol.* **71**:3588-96.
169. Fouchier, R. A. M., B. E. Meyer, J. H. M. Simon, U. Fischer, A. V. Albright, F. Gonzalez-Scarano, and M. H. Malim. 1998. Interaction of the Human

- Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Protein with the Nuclear Pore Complex. *J. Virol.* **72**:6004-13.
170. Fragoso, R., D. Ren, X. Zhang, M. W. Su, S. J. Burakoff, and Y. J. Jin. 2003. Lipid raft distribution of CD4 depends on its palmitoylation and association with Lck, and evidence for CD4-induced lipid raft aggregation as an additional mechanism to enhance CD3 signaling. *J. Immunol.* **170**:913-21.
 171. Franke, E. K., H. E. Yuan, K. L. Bossolt, S. P. Goff, and J. Luban. 1994. Specificity and sequence requirements for interactions between various retroviral Gag proteins. *J. Virol.* **68**:5300-5.
 172. Franke, E. K., H. E. Yuan, and J. Luban. 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**:359-62.
 173. Freed, E. O., and M. A. Martin. 1996. Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J. Virol.* **70**:341-51.
 174. Friborg, J., A. Ladha, H. Gottlinger, W. A. Haseltine, and E. A. Cohen. 1995. Functional analysis of the phosphorylation sites on the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **8**:10-22.
 175. Fu, W., R. J. Gorelick, and A. Rein. 1994. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 dimeric RNA from wild-type and protease-defective virions. *J. Virol.* **68**:5013-8.
 176. Fujita, K., S. Omura, and J. Silver. 1997. Rapid degradation of CD4 in cells expressing human immunodeficiency virus type 1 Env and Vpu is blocked by proteasome inhibitors. *J. Gen. Virol.* **76**:619-25.
 177. Fukuda, M., S. Asano, T. Nakamura, M. Adachi, M. Yoshida, M. Yanagida, and E. Nishida. 1997. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* **390**:308-11.
 178. Fukushi, S., C. Kurihara, N. Ishiyama, F. Hoshino, A. Oya, and K. Katayama. 1997. The sequence element of the internal ribosome entry site and a 25-kilodalton cellular protein contribute to efficient internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* **71**:1662-66.
 179. Furtado, M. R., L. A. Kingsley, and S. M. Wolinsky. 1995. Changes in the viral mRNA expression pattern correlate with a rapid rate of CD4+ T-cell number decline in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* **69**:2092-100.
 180. Furuta, R. A., C. T. Wild, Y. Weng, and C. D. Weiss. 1998. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat. Struct. Biol.* **5**:276-9.
 181. Gabuzda, D., K. Lawrence, E. Langhoff, E. Terwilliger, T. Dorfman, W. Haseltine, and J. Sodroski. 1992. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* **66**:6489-95.
 182. Gaines, H., M. A. von Sydow, L. V. von Stedingk, G. Biberfeld, B. Bottiger, L. O. Hansson, P. Lundbergh, A. B. Sonnerborg, J. Wasserman, and O. O. Strannegaard. 1990. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* **4**:995-9.

183. Gallay, P., T. Hope, D. Chin, and D. Trono. 1997. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *PNAS* **94**:9825-30.
184. Gallay, P., S. Swingler, C. Aiken, and D. Trono. 1995. HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* **80**:379-88.
185. Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, and M. Popovic. 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:865-7.
186. Gamble, T. R., S. Yoo, F. F. Vajdos, U. K. von Schwedler, D. K. Worthylake, H. Wang, J. P. McCutcheon, W. I. Sundquist, and C. P. Hill. 1997. Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* **278**:849-53.
187. Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn. 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature* **397**:436-41.
188. Garcia, J. A., F. K. Wu, R. Mitsuyasu, and R. B. Gaynor. 1987. Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *EMBO* **6**:3761-70.
189. Garcia, J. V., and A. D. Miller. 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* **350**:508-11.
190. Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka, and W. I. Sundquist. 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**:55-65.
191. Gay, D., S. Buus, J. Pasternak, J. Kappler, and P. Marrack. 1988. The T-cell accessory molecule CD4 recognizes a monomorphic determinant on isolated Ia. *PNAS* **85**:5629-33.
192. Gay, D., P. Maddon, R. Sekaly, M. A. Talle, M. Godfrey, E. Long, G. Goldstein, L. Chess, R. Axel, J. Kappler, and et al. 1987. Functional interaction between human T-cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen. *Nature* **328**:626-9.
193. Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duinhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**:587-97.
194. Geijtenbeek, T. B., and Y. van Kooyk. 2003. DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **276**:31-54.
195. Gelderblom, H. R., E. H. Hausmann, M. Ozel, G. Pauli, and M. A. Koch. 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* **156**:171-6.

196. Gelderblom, H. R., M. Ozel, and G. Pauli. 1989. Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. *Arch. Virol.* **106**:1-13.
197. Gelmann, E. P., M. Popovic, D. Blayney, H. Masur, G. Sidhu, R. E. Stahl, and R. C. Gallo. 1983. Proviral DNA of a retrovirus, human T-cell leukemia virus, in two patients with AIDS. *Science* **220**:862-5.
198. Gibbs, J. S., A. A. Lackner, S. M. Lang, M. A. Simon, P. K. Sehgal, M. D. Daniel, and R. C. Desrosiers. 1995. Progression to AIDS in the absence of a gene for vpr or vpx. *J. Virol.* **69**:2378-83.
199. Gibbs, J. S., D. A. Regier, and R. C. Desrosiers. 1994. Construction and in vitro properties of HIV-1 mutants with deletions in "nonessential" genes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:343-50.
200. Gluzman, Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**:175-82.
201. Goddard, C., A. Aquino, R. I. Glazer, and R. L. Felsted. 1989. Chemical characterization of p17gag from human immunodeficiency virus as an N-terminally myristoylated protein. *Eur. J. Biochem.* **182**:323-6.
202. Goff, S. P. 1992. Genetics of retroviral integration. *Annu. Rev. Genet.* **26**:527-44.
203. Goh, W. C., M. E. Rogel, C. M. Kinsey, S. F. Michael, P. N. Fultz, M. A. Nowak, B. H. Hahn, and M. Emerman. 1998. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat. Med.* **4**:65-71.
204. Goncalves, J., Y. Korin, J. Zack, and D. Gabuzda. 1996. Role of Vif in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J. Virol.* **70**:8701-8709.
205. Gong, W., O. M. Z. Howard, J. A. Turpin, M. C. Grimm, H. Ueda, P. W. Gray, C. J. Raport, J. J. Oppenheim, and J. M. Wang. 1998. Monocyte Chemotactic Protein-2 Activates CCR5 and Blocks CD4/CCR5-mediated HIV-1 Entry/Replication. *J. Biol. Chem.* **273**:4289-92.
206. Gonzalez, M. E., and L. Carrasco. 2001. Human immunodeficiency virus type 1 VPU protein affects Sindbis virus glycoprotein processing and enhances membrane permeabilization. *Virology* **279**:201-9.
207. Gonzalez, M. E., and L. Carrasco. 1998. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein enhances membrane permeability. *Biochemistry* **37**:13710-9.
208. Gorlich, D., F. Vogel, A. D. Mills, E. Hartmann, and R. A. Laskey. 1995. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* **377**:246-8.
209. Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon. 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **305**:1425-31.
210. Gottlinger, H. G., T. Dorfman, E. A. Cohen, and W. A. Haseltine. 1993. Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *PNAS* **90**:7381-5.

211. Gottlinger, H. G., T. Dorfman, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *PNAS* **88**:3195-9.
212. Gottlinger, H. G., J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *PNAS* **86**:5781-5.
213. Goudsmit, J. 1995. The role of viral diversity in HIV pathogenesis. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **10** Suppl 1:S15-9.
214. Graham, D. R., E. Chertova, J. M. Hilburn, L. O. Arthur, and J. E. Hildreth. 2003. Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts. *J. Virol.* **77**:8237-48.
215. Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**:59-74.
216. Granelli-Piperno, A., B. Moser, M. Pope, D. Chen, Y. Wei, F. Isdell, U. O'Doherty, W. Paxton, R. Koup, S. Mojsos, N. Bhardwaj, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and R. M. Steinman. 1996. Efficient Interaction of HIV-1 with Purified Dendritic Cells via Multiple Chemokine Coreceptors. *J. Exp. Med.* **184**:2433-38.
217. Gratton, S., X. J. Yao, S. Venkatesan, E. A. Cohen, and R. P. Sekaly. 1996. Molecular analysis of the cytoplasmic domain of CD4: overlapping but noncompetitive requirement for lck association and down-regulation by Nef. *J. Immunol.* **157**:3305-11.
218. Greutorex, J., and A. Lever. 1998. Retroviral RNA dimer linkage. *J. Gen. Virol.* **79**:2877-2882.
219. Greenberg, M. E., S. Bronson, M. Lock, M. Neumann, G. N. Pavlakis, and J. Skowronski. 1997. Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO* **16**:6964-76.
220. Grewe, C., A. Beck, and H. R. Gelderblom. 1990. HIV: early virus-cell interactions. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **3**:965-74.
221. Grief, C., M. V. Nermut, and D. J. Hockley. 1994. A morphological and immunolabelling study of freeze-substituted human and simian immunodeficiency viruses. *Micron* **25**:119-28.
222. Grotzinger, J. 2002. Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**:215-23.
223. Gumuluru, S., M. Kinsey, C., and M. Emmerman. 2000. An in vitro rapid-turnover assay for human immunodeficiency virus type 1 replication selects for cell-to-cell spread of virus. *J. Virol.* **74**:10882-91.
224. Guyader, M., M. Emerman, P. Sonigo, F. Clavel, L. Montagnier, and M. Alizon. 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**:662-9.
225. Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock, and P. M. Sharp. 2000. AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. *Science* **287**:607-14.

226. Handley, M. A., S. Paddock, A. Dall, and A. T. Panganiban. 2001. Association of Vpu-binding protein with microtubules and Vpu-dependent redistribution of HIV-1 Gag protein. *Virology* **291**:198-207.
227. Harada, S., Y. Koyanagi, and N. Yamamoto. 1985. Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* **229**:563-6.
228. Harris, R. S., K. N. Bishop, A. M. Sheehy, H. M. Craig, S. K. Petersen-Mahrt, I. N. Watt, M. S. Neuberger, and M. H. Malim. 2003. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* **113**:803-9.
229. Hart, T. K., R. Kirsh, H. Ellens, R. W. Sweet, D. M. Lambert, S. R. Petteway, Jr., J. Leary, and P. J. Bugelski. 1991. Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. *PNAS* **88**:2189-93.
230. Hartley, C. A., M. J. Gilbert, L. Brigido, T. Elbeik, J. A. Levy, S. M. Crowe, and J. Mills. 1996. Human immunodeficiency virus grown in CD4-expressing cells is associated with CD4. *J. Gen. Virol.* **77** :2015-23.
231. Haverkos, H. W., and J. W. Curran. 1982. The current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections. *CA Cancer J. Clin.* **32**:330-9.
232. He, J., Y. Chen, M. Farzan, H. Choe, A. Ohagen, S. Gartner, J. Busciglio, X. Yang, W. Hofmann, W. Newman, C. R. Mackay, J. Sodroski, and D. Gabuzda. 1997. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* **385**:645-9.
233. Heinzinger, N. K., M. I. Bukinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, and M. Emerman. 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *PNAS* **91**:7311-5.
234. Heisig, V., T. Benter, S. F. Josephs, M. R. Sadaie, T. Okamoto, R. C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1987. Interaction of viral and cellular factors with the HTLV-III LTR target sequences in vitro. *Haematol. Blood Transfus.* **31**:423-9.
235. Henderson, B. R., and P. Percipalle. 1997. Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J. Mol. Biol.* **274**:693-707.
236. Henklein, P., R. Kinder, U. Schubert, and B. Bechinger. 2000. Membrane interactions and alignment of structures within the HIV-1 Vpu cytoplasmic domain: effect of phosphorylation of serines 52 and 56. *FEBS Lett.* **482**:220-4.
237. Herrmann, C. H., and A. P. Rice. 1995. Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor. *J. Virol.* **69**:1612-20.
238. Hill, C. P., D. Worthylake, D. P. Bancroft, A. M. Christensen, and W. I. Sundquist. 1996. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *PNAS* **93**:3099-104.

239. Hindmarsh, P., T. Ridky, R. Reeves, M. Andrade, A. M. Skalka, and J. Leis. 1999. HMG Protein Family Members Stimulate Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Avian Sarcoma Virus Concerted DNA Integration In Vitro. *J. Virol.* **73**:2994-3003.
240. Ho, D. D., T. R. Rota, and M. S. Hirsch. 1985. Antibody to lymphadenopathy-associated virus in AIDS. *N. Engl. J. Med.* **312**:649-50.
241. Ho, D. D., T. R. Rota, R. T. Schooley, J. C. Kaplan, J. D. Allan, J. E. Groopman, L. Resnick, D. Felsenstein, C. A. Andrews, and M. S. Hirsch. 1985. Isolation of HTLV-III from cerebrospinal fluid and neural tissues of patients with neurologic syndromes related to the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* **313**:1493-7.
242. Ho, D. H., A. U. Neumann, A. P. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123-126.
243. Holm, K., K. Weclawicz, R. Hewson, and M. Suomalainen. 2003. Human immunodeficiency virus type 1 assembly and lipid rafts: Pr55(gag) associates with membrane domains that are largely resistant to Brij98 but sensitive to Triton X-100. *J. Virol.* **77**:4805-17.
244. Holsinger, L. J., and R. A. Lamb. 1991. Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* **183**:32-43.
245. Holsinger, L. J., D. Nichani, L. H. Pinto, and R. A. Lamb. 1994. Influenza A virus M2 ion channel protein: a structure-function analysis. *J. Virol.* **68**:1551-63.
246. Hrimech, M., X. J. Yao, F. Bachand, N. Rougeau, and E. A. Cohen. 1999. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr functions as an immediate-early protein during HIV-1 infection. *J. Virol.* **73**:4101-9.
247. Huang, M., and M. A. Martin. 1997. Incorporation of Pr160(gag-pol) into virus particles requires the presence of both the major homology region and adjacent C-terminal capsid sequences within the Gag-Pol polyprotein. *J. Virol.* **71**:4472-8.
248. Huang, M., J. M. Orenstein, M. A. Martin, and E. O. Freed. 1995. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J. Virol.* **69**:6810-8.
249. Huang, Y., W. A. Paxton, S. M. Wolinsky, A. U. Neumann, L. Zhang, T. He, S. Kang, D. Ceradini, Z. Jin, K. Yazdanbakhsh, K. Kunstman, D. Erickson, E. Dragon, N. R. Landau, J. Phair, D. D. Ho, and R. A. Koup. 1996. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.* **2**:1240-3.
250. Huet, T., R. Cheynier, A. Meyerhans, G. Roelants, and S. Wain-Hobson. 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* **345**:356-58.
251. Hwang, S. S., T. J. Boyle, H. K. Lyerly, and B. R. Cullen. 1991. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* **253**:71-4.

252. Iwatani, Y., S. K. Song, L. Wang, J. Planas, H. Sakai, A. Ishimoto, and M. W. Cloyd. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu modifies viral cytopathic effect through augmented virus release. *J. Gen. Virol.* **78**:841-6.
253. Jabbar, M. A., and D. P. Nayak. 1990. Intracellular interaction of human immunodeficiency virus type 1 (ARV-2) envelope glycoprotein gp160 with CD4 blocks the movement and maturation of CD4 to the plasma membrane. *J. Virol.* **64**:6297-304.
254. Jacks, T., M. D. Power, F. R. Masiarz, P. A. Luciw, P. J. Barr, and H. E. Varmus. 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**:280-3.
255. Jacotot, E., K. F. Ferri, C. El Hamel, C. Brenner, S. Druillennec, J. Hoebeke, P. Rustin, D. Metivier, C. Lenoir, M. Geuskens, H. L. Vieira, M. Loeffler, A. S. Belzacq, J. P. Briand, N. Zamzami, L. Edelman, Z. H. Xie, J. C. Reed, B. P. Roques, and G. Kroemer. 2001. Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2. *J. Exp. Med.* **193**:509-19.
256. Jacotot, E., L. Ravagnan, M. Loeffler, K. F. Ferri, H. L. Vieira, N. Zamzami, P. Costantini, S. Druillennec, J. Hoebeke, J. P. Briand, T. Irinopoulou, E. Daugas, S. A. Susin, D. Cointe, Z. H. Xie, J. C. Reed, B. P. Roques, and G. Kroemer. 2000. The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J. Exp. Med.* **191**:33-46.
257. Jinno, A., N. Shimizu, Y. Soda, Y. Haraguchi, T. Kitamura, and H. Hoshino. 1998. Identification of the chemokine receptor TER1/CCR8 expressed in brain-derived cells and T cells as a new coreceptor for HIV-1 infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**:497-502.
258. Johnson, J. E., W. Rodgers, and J. K. Rose. 1998. A plasma membrane localization signal in the HIV-1 envelope cytoplasmic domain prevents localization at sites of vesicular stomatitis virus budding and incorporation into VSV virions. *Virology* **251**:244-52.
259. Johnson, M. S., M. A. McClure, D. F. Feng, J. Gray, and R. F. Doolittle. 1986. Computer analysis of retroviral pol genes: assignment of enzymatic functions to specific sequences and homologies with nonviral enzymes. *PNAS* **83**:7648-52.
260. Jones, H. W., Jr., V. A. McKusick, P. S. Harper, and K. D. Wu. 1971. George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet. Gynecol.* **38**:945-9.
261. Jones, K. A. 1997. Taking a new TAK on tat transactivation. *Genes Dev.* **11**:2593-9.
262. Julius, M., K. Newell, C. Maroun, and L. Haughn. 1991. Functional consequences of CD4-TCR/CD3 interactions. *Semin. Immunol.* **3**:161-6.
263. Kaminchik, J., R. Margalit, S. Yaish, H. Drummer, B. Amit, N. Sarver, M. Gorecki, and A. Panet. 1994. Cellular distribution of HIV type 1 Nef protein: identification of domains in Nef required for association with membrane and detergent-insoluble cellular matrix. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:1003-10.

264. Kanki, P. J., F. Barin, S. M'Boup, J. S. Allan, J. L. Romet-Lemonne, R. Marlink, M. F. McLane, T. H. Lee, B. Arbeille, F. Denis, and et al. 1986. New human T-lymphotropic retrovirus related to simian T-lymphotropic virus type III (STLV-IIIAGM). *Science* **232**:238-43.
265. Karageorgos, L., P. Li, and C. Burrell. 1993. Characterization of HIV replication complexes early after cell-to-cell infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**:817-23.
266. Kawamura, I., Y. Koga, N. Oh-Hori, K. Onodera, G. Kimura, and K. Nomoto. 1989. Depletion of the surface CD4 molecule by the envelope protein of human immunodeficiency virus expressed in a human CD4+ monocytoid cell line. *J. Virol.* **63**:3748-54.
267. Kerkau, T., I. Bacik, J. R. Bennink, J. W. Yewdell, T. Hünig, A. Schimpl, and U. Shubert. 1997. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu proteins interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex class I molecules. *J. Exp. Med.* **185**:1295-1305.
268. Kestler, H. W., 3rd, D. J. Ringler, K. Mori, D. L. Panicali, P. K. Sehgal, M. D. Daniel, and R. C. Desrosiers. 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**:651-62.
269. Khan, E., J. P. Mack, R. A. Katz, J. Kulkosky, and A. M. Skalka. 1991. Retroviral integrase domains: DNA binding and the recognition of LTR sequences. *Nucleic Acids Res.* **19**:851-60.
270. Kim, S. J., M. Y. Kim, J. H. Lee, J. C. You, and S. Jeong. 2002. Selection and Stabilization of the RNA Aptamers against the Human Immunodeficiency Virus Type-1 Nucleocapsid Protein. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* **291**:925-31.
271. Kimpton, J., and M. Emerman. 1992. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J. Virol.* **66**: 2232-9.
272. Kimura, T., M. Nishikawa, and A. Ohyama. 1994. Intracellular membrane traffic of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins: vpu liberates Golgi-targeted gp160 from CD4-dependent retention in the endoplasmic reticulum. *J. Biochem.* **115**:1010-20.
273. Kino, T., A. Gragerov, J. B. Kopp, R. H. Stauber, G. N. Pavlakis, and G. P. Chrousos. 1999. The HIV-1 virion-associated protein vpr is a coactivator of the human glucocorticoid receptor. *J. Exp. Med.* **189**:51-62.
274. Kirchhoff, F., T. C. Greenough, D. B. Brettler, J. L. Sullivan, and R. C. Desrosiers. 1995. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* **332**:228-232.
275. Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**:767-8.

276. Klimkait, T., K. Strebel, M. D. Hoggan, M. A. Martin, and J. M. Orenstein. 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J. Virol.* **64**:621-9.
277. Klotman, M. E., S. Y. Kim, A. Buchbinder, A. DeRossi, D. Baltimore, and F. Wong-Staal. 1992. Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes. *PNAS* **89**:1148.
278. Kondo, E., F. Mammano, E. A. Cohen, and H. G. Gottlinger. 1995. The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J. Virol.* **69**:2759-64.
279. Konig, R., L. Y. Huang, and R. N. Germain. 1992. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* **356**:796-8.
280. Koonin, E. V., and R. A. Abagyan. 1997. TSG101 may be the prototype of a class of dominant negative ubiquitin regulators. *Nat. Genet.* **16**:330-1.
281. Koot, M., A. B. van 't Wout, N. A. Kootstra, R. E. de Goede, M. Tersmette, and H. Schuitemaker. 1996. Relation between changes in cellular load, evolution of viral phenotype, and the clonal composition of virus populations in the course of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Infect. Dis.* **173**:349-54.
282. Kotov, A., J. Zhou, P. Flicker, and C. Aiken. 1999. Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core. *J. Virol.* **73**:8824-8830.
283. Kowalski, M., J. Potz, L. Basiripour, T. Dorfman, W. C. Goh, E. Terwilliger, A. Dayton, C. Rosen, W. Haseltine, and J. Sodroski. 1987. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* **237**:1351-5.
284. Krausslich, H. G., M. Facke, A. M. Heuser, J. Konvalinka, and H. Zentgraf. 1995. The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity. *J. Virol.* **69**:3407-19.
285. Kulkosky, J., K. S. Jones, R. A. Katz, J. P. Mack, and A. M. Skalka. 1992. Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. *Mol. Cell. Biol.* **12**:2331-8.
286. Kwong, P. D., S. E. Ryu, W. A. Hendrickson, R. Axel, R. M. Sweet, G. Folena-Wasserman, P. Hensley, and R. W. Sweet. 1990. Molecular characteristics of recombinant human CD4 as deduced from polymorphic crystals. *PNAS* **87**:6423-7.
287. Kwong, P. D., R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**:648-59.
288. LaBranche, C. C., T. L. Hoffman, J. Romano, B. S. Haggarty, T. G. Edwards, T. J. Matthews, R. W. Doms, and J. A. Hoxie. 1999. Determinants of CD4 independence for a human immunodeficiency virus type 1 variant map outside regions required for coreceptor specificity. *J. Virol.* **73**:10310-9.

289. LaBranche, C. C., M. M. Sauter, B. S. Haggarty, P. J. Vance, J. Romano, T. K. Hart, P. J. Bugelski, and J. A. Hoxie. 1994. Biological, molecular, and structural analysis of a cytopathic variant from a molecularly cloned simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **68**:5509-22.
290. Lacoste, J., M. D'Addario, A. Roulston, M. A. Wainberg, and J. Hiscott. 1990. Cell-specific differences in activation of NF-kappa B regulatory elements of human immunodeficiency virus and beta interferon promoters by tumor necrosis factor. *J. Virol.* **64**:4726-34.
291. Lama, J., A. Mangasarian, and D. Trono. 1999. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr. Biol.* **9**:622-31.
292. Laney, J. D., and M. Hochstrasser. 1999. Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* **97**:427-30.
293. Lang, S. M., M. Weeger, C. Stahl-Hennig, C. Coulibaly, G. Hunsmann, J. Muller, H. Muller-Hermelink, D. Fuchs, H. Wachter, M. M. Daniel, and et al. 1993. Importance of vpr for infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **67**:902-12.
294. Lapham, C. K., J. Ouyang, B. Chandrasekhar, N. Y. Nguyen, D. S. Dimitrov, and H. Golding. 1996. Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* **274**:602-5.
295. Lasky, L. A., G. Nakamura, D. H. Smith, C. Fennie, C. Shimasaki, E. Patzer, P. Berman, T. Gregory, and D. J. Capon. 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* **50**:975-85.
296. Laughlin, M. A., and R. J. Pomerantz. 1994. Cellular latency in HIV-1 infection. *Clin. Lab. Med.* **14**:239-55.
297. Learmont, J. C., A. F. Geczy, J. Mills, L. J. Ashton, C. H. Raynes-Greenow, R. J. Garsia, W. B. Dyer, L. McIntyre, R. B. Oelrichs, and a. Rhodes et. 1999. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N. Engl. J. Med.* **340**:1715-22.
298. Lecossier, D., F. Bouchonnet, F. Clavel, and A. J. Hance. 2003. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* **300**:1112.
299. Lee, P. P., and M. L. Linial. 1994. Efficient particle formation can occur if the matrix domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag is substituted by a myristylation signal. *J. Virol.* **68**:6644-54.
300. Lemmon, M. A., and J. Schlessinger. 1994. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.* **19**:459-63.
301. Lemmon, S. K., and L. M. Traub. 2000. Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12**:457-66.
302. Lemp, G. F., A. M. Hirozawa, J. B. Cohen, P. A. Derish, K. C. McKinney, and S. R. Hernandez. 1992. Survival for women and men with AIDS. *J. Infect. Dis.* **166**:74-9.

303. Lenburg, M. E., and N. R. Landau. 1993. Vpu induced degradation of CD4: requirement for specific amino acid residues in the cytoplasmic domain of CD4. *J. Virol.* **67**:7238-45.
304. Leonard, C. K., M. W. Spellman, L. Riddle, R. J. Harris, J. N. Thomas, and T. J. Gregory. 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **265**:10373-82.
305. Levy, D. N., L. S. Fernandes, W. V. Williams, and D. B. Weiner. 1993. Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus 1 vpr. *Cell* **72**:541-50.
306. Levy, J. A. 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev.* **57**:183-289.
307. Lewis, P., M. Hensel, and M. Emerman. 1992. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO* **11**:3053-8.
308. Lewis, P. F., and M. Emerman. 1994. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **68**:510-6.
309. Lillehoj, E. P., F. H. Salazar, R. J. Mervis, M. G. Raum, H. W. Chan, N. Ahmad, and S. Venkatesan. 1988. Purification and structural characterization of the putative gag-pol protease of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **62**:3053-58.
310. Lin, G., F. Baribaud, J. Romano, R. W. Doms, and J. A. Hoxie. 2003. Identification of gp120 binding sites on CXCR4 by using CD4-independent human immunodeficiency virus type 2 Env proteins. *J. Virol.* **77**:931-42.
311. Lindwasser, O. W., and M. D. Resh. 2001. Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J. Virol.* **75**:7913-24.
312. Lindwasser, O. W., and M. D. Resh. 2002. Myristoylation as a target for inhibiting HIV assembly: unsaturated fatty acids block viral budding. *PNAS* **99**:13037-42.
313. Lingappa, J. R., R. L. Hill, M. L. Wong, and R. S. Hegde. 1997. A multistep, ATP-dependent pathway for assembly of human immunodeficiency virus capsids in a cell-free system. *J. Cell. Biol.* **136**:567-81.
314. Liu, L., and A. Chander. 1995. Stilbene disulfonic acids inhibit synexin-mediated membrane aggregation and fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **1254**:274-82.
315. Liu, R., W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup, and N. R. Landau. 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**:367-77.
316. Liu, Z. Q., S. Muhkerjee, M. Sahni, C. McCormick-Davis, K. Leung, Z. Li, V. H. Gattone, 2nd, C. Tian, R. W. Doms, T. L. Hoffman, R. Raghavan, O. Narayan, and E. B. Stephens. 1999. Derivation and biological characterization of a molecular clone of SHIV(KU-2) that causes AIDS, neurological disease, and renal disease in rhesus macaques. *Virology* **260**:295-307.

317. Lodge, R., H. Gottlinger, D. Gabuzda, E. A. Cohen, and G. Lemay. 1994. The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J. Virol.* **68**:4857-61.
318. Loetscher, M., T. Geiser, T. O'Reilly, R. Zwahlen, M. Baggiolini, and B. Moser. 1994. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J. Biol. Chem.* **269**:232-7.
319. Lopata, M. A., D. W. Cleveland, and B. Sollner-Webb. 1984. High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res.* **12**:5707-17.
320. Lu, M., S. C. Blacklow, and P. S. Kim. 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat. Struct. Biol.* **2**:1075-82.
321. Luban, J. 1996. Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell* **87**:1157-9.
322. Lum, J. J., O. J. Cohen, Z. Nie, J. G. Weaver, T. S. Gomez, X. J. Yao, D. Lynch, A. A. Pilon, N. Hawley, J. E. Kim, Z. Chen, M. Montpetit, J. Sanchez-Dardon, E. A. Cohen, and A. D. Badley. 2003. Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J. Clin. Invest.* **111**:1547-54.
323. Lynch, G. W., A. J. Sloane, V. Raso, A. Lai, and A. L. Cunningham. 1999. Direct evidence for native CD4 oligomers in lymphoid and monocytoid cells. *Eur. J. Immunol.* **29**:2590-602.
324. Mackay, G. A., Y. Niu, Z. Q. Liu, S. Mukherjee, Z. Li, I. Adany, S. Buch, W. Zhuge, H. M. McClure, O. Narayan, and M. S. Smith. 2002. Presence of Intact vpu and nef genes in nonpathogenic SHIV is essential for acquisition of pathogenicity of this virus by serial passage in macaques. *Virology* **295**:133-46.
325. Madani, N., and D. Kabat. 1998. An Endogenous Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus in Human Lymphocytes Is Overcome by the Viral Vif Protein. *J. Virol.* **72**:10251-5.
326. Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**:333-48.
327. Maddon, P. J., D. R. Littman, M. Godfrey, D. E. Maddon, L. Chess, and R. Axel. 1985. The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell* **42**:93-104.
328. Mak, J., M. Jiang, M. A. Wainberg, M. L. Hammariskjold, D. Rekosh, and L. Kleiman. 1994. Role of Pr160gag-pol in mediating the selective incorporation of tRNA(Lys) into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* **68**:2065-72.
329. Mak, J., A. Khorchid, Q. Cao, Y. Huang, I. Lowy, M. A. Parniak, V. R. Prasad, M. A. Wainberg, and L. Kleiman. 1997. Effects of mutations in Pr160gag-pol upon tRNA(Lys3) and Pr160gag-plo incorporation into HIV-1. *J. Mol. Biol.* **265**:419-31.

330. Maldarelli, F., M.-Y. Chen, R. L. Willey, and K. Strebel. 1993. Human immunodeficiency virus type vpu is an oligomeric type I integral membrane protein. *J. Virol.* **67**:5056-61.
331. Maldarelli, F., M. A. Martin, and K. Strebel. 1991. Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation. *J. Virol.* **65**:5732-43.
332. Malim, M. H., L. S. Tiley, D. F. McCarn, J. R. Rusche, J. Hauber, and B. R. Cullen. 1990. HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell* **60**:675-83.
333. Mammano, F., A. Ohagen, S. Hoglund, and H. G. Gottlinger. 1994. Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *J. Virol.* **68**:4927-36.
334. Manes, S., G. del Real, R. A. Lacalle, P. Lucas, C. Gomez-Mouton, S. Sanchez-Palomino, R. Delgado, J. Alcamí, E. Mira, and A. C. Martinez. 2000. Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO* **1**:190-6.
335. Manes, S., R. A. Lacalle, C. Gomez-Mouton, G. del Real, E. Mira, and A. C. Martinez. 2001. Membrane raft microdomains in chemokine receptor function. *Semin. Immunol.* **13**:147-57.
336. Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin, and D. Trono. 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**:99-103.
337. Manninen, A., M. Hiipakka, M. Vihinen, W. Lu, B. J. Mayer, and K. Saksela. 1998. SH3-Domain binding function of HIV-1 Nef is required for association with a PAK-related kinase. *Virology* **250**:273-82.
338. Mansky, L. M., and H. M. Temin. 1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.* **69**:5087-94.
339. Marechal, V., M. C. Prevost, C. Petit, E. Perret, J. M. Heard, and O. Schwartz. 2001. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J. Virol.* **75**:11166-77.
340. Margottin, F., S. Benichou, H. Durand, V. Richard, L.-X. Liu, E. Gomas, and R. Benarous. 1996. Interactions between the cytoplasmic domains of HIV-1 Vpu and CD4: role of Vpu residues involved in CD4 interaction and *in vitro* CD4 degradation. *Virology* **223**:381-86.
341. Margottin, F., S. P. Bour, H. Durand, L. Selig, S. Bénichou, V. Richard, D. Thomas, D. Strebel, and R. Benarous. 1998. A novel human WD protein, h-bTrCP, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the degradation pathway through an F-box motif. *Mol. Cell.* **1**:565-74.
342. Mariani, R., D. Chen, B. Schrofelbauer, F. Navarro, R. König, B. Bollman, C. Munk, H. Nymark-McMahon, and N. R. Landau. 2003. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**:21-31.
343. Marzio, G., M. Tyagi, M. I. Gutierrez, and M. Giacca. 1998. HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter. *PNAS* **95**:13519-24.

344. Massiah, M. A., M. R. Starich, C. Paschall, M. F. Summers, A. M. Christensen, and W. I. Sundquist. 1994. Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J. Mol. Biol.* **244**:198-223.
345. Massiah, M. A., D. Worthylake, A. M. Christensen, W. I. Sundquist, C. P. Hill, and M. F. Summers. 1996. Comparison of the NMR and X-ray structures of the HIV-1 matrix protein: evidence for conformational changes during viral assembly. *Protein Sci.* **5**:2391-8.
346. Masur, H., M. A. Michelis, J. B. Greene, I. Onorato, R. A. Stouwe, R. S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H. W. Murray, and S. Cunningham-Rundles. 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N. Engl. J. Med.* **305**:1431-8.
347. Matsuda, Z., M. J. Chou, M. Matsuda, J. H. Huang, Y. M. Chen, R. Redfield, K. Mayer, M. Essex, and T. H. Lee. 1988. Human immunodeficiency virus type 1 has an additional coding sequence in the central region of the genome. *PNAS* **85**:6968-72.
348. McCormick-Davis, C., L. J. Zhao, S. Mukherjee, K. Leung, D. Sheffer, S. V. Joag, O. Narayan, and E. B. Stephens. 1998. Chronology of genetic changes in the vpu, env, and nef genes of chimeric simian-human immunodeficiency virus (strain HXB2) during acquisition of virulence for pig-tailed macaques. *Virology* **248**:275-83.
349. McDonell, M. W., M. N. Simon, and F. W. Studier. 1977. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* **110**:119-46.
350. Meerloo, T., H. K. Parmentier, A. D. Osterhaus, J. Goudsmit, and H. J. Schuurman. 1992. Modulation of cell surface molecules during HIV-1 infection of H9 cells. An immunoelectron microscopic study. *AIDS* **6**:1105-16.
351. Mellors, J. W., C. R. Rinaldo, Jr., P. Gupta, R. M. White, J. A. Todd, and L. A. Kingsley. 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* **272**:1167-70.
352. Miceli, M. C., and J. R. Parnes. 1993. Role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Adv. Immunol.* **53**:59-122.
353. Millan, J., J. Cerny, V. Horejsi, and M. A. Alonso. 1999. CD4 segregates into specific detergent-resistant T-cell membrane microdomains. *Tissue Antigens* **53**:33-40.
354. Mo, H., S. Monard, H. Pollack, J. Ip, G. Rochford, L. Wu, J. Hoxie, W. Borkowsky, D. D. Ho, and J. P. Moore. 1998. Expression patterns of the HIV type 1 coreceptors CCR5 and CXCR4 on CD4+ T cells and monocytes from cord and adult blood. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**:607-17.
355. Modrow, S., B. H. Hahn, G. M. Shaw, R. C. Gallo, F. Wong-Staal, and H. Wolf. 1987. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J. Virol.* **61**:570-8.

356. Moebius, U., L. K. Clayton, S. Abraham, A. Diener, J. Yunis, S. C. Harrison, and E. L. Reinherz. 1992. Human immunodeficiency virus gp120 binding C'C" ridge of CD4 domain 1 is also involved in interaction with class II major histocompatibility complex molecules. *PNAS* **89**:12008-12.
357. Moebius, U., P. Pallai, S. C. Harrison, and E. L. Reinherz. 1993. Delineation of an extended surface contact area on human CD4 involved in class II major histocompatibility complex binding. *PNAS* **90**:8259-63.
358. Moldovan, M. C., A. Yachou, K. Levesque, H. Wu, W. A. Hendrickson, E. A. Cohen, and R. P. Sekaly. 2002. CD4 dimers constitute the functional component required for T cell activation. *J. Immunol.* **169**:6261-8.
359. Moore, J. P. 1997. Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science* **276**:51-2.
360. Moore, J. P. 1990. Simple methods for monitoring HIV-1 and HIV-2 gp120 binding to soluble CD4 by enzyme-linked immunosorbent assay: HIV-2 has a 25-fold lower affinity than HIV-1 for soluble CD4. *AIDS* **4**:297-305.
361. Moore, J. P., A. Trkola, and T. Dragic. 1997. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr. Opin. Immunol.* **9**:551-62.
362. Morikawa, Y., T. Goto, and K. Sano. 1999. In vitro assembly of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J. Biol. Chem.* **274**:27997-8002.
363. Morikawa, Y., D. J. Hockley, M. V. Nermut, and I. M. Jones. 2000. Roles of matrix, p2, and N-terminal myristoylation in human immunodeficiency virus type 1 Gag assembly. *J. Virol.* **74**:16-23.
364. Morikawa, Y., W. H. Zhang, D. J. Hockley, M. V. Nermut, and I. M. Jones. 1998. Detection of a trimeric human immunodeficiency virus type 1 Gag intermediate is dependent on sequences in the matrix protein, p17. *J. Virol.* **72**:7659-63.
365. Moscicki, R. A., E. P. Amento, S. M. Krane, J. T. Kurnick, and R. B. Colvin. 1983. Modulation of surface antigens of a human monocyte cell line, U937, during incubation with T lymphocyte-conditioned medium: detection of T4 antigen and its presence on normal blood monocytes. *J. Immunol.* **131**:743-8.
366. Moulard, M., S. Hallenberger, W. Garten, and H. D. Klenk. 1999. Processing and routage of HIV glycoproteins by furin to the cell surface. *Virus Res.* **60**:55-65.
367. Murakami, T., and E. O. Freed. 2000. Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J. Virol.* **74**:3548-54.
368. Nahmias, A. J., J. Weiss, X. Yao, F. Lee, R. Kodsi, M. Schanfield, T. Matthews, D. Bolognesi, D. Durack, A. Motulsky, and et al. 1986. Evidence for human infection with an HTLV III/LAV-like virus in Central Africa, 1959. *Lancet* **1**:1279-80.
369. Navia, M. A., P. M. Fitzgerald, B. M. McKeever, C. T. Leu, J. C. Heimbach, W. K. Herber, I. S. Sigal, P. L. Darke, and J. P. Springer. 1989. Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* **337**:615-620.

370. Nguyen, D. G., and J. E. Hildreth. 2003. Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur. J. Immunol.* **33**:483-93.
371. Nguyen, D. H., and J. E. Hildreth. 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J. Virol.* **74**:3264-72.
372. Nguyen, D. H., and D. Taub. 2002. Cholesterol is essential for macrophage inflammatory protein 1 beta binding and conformational integrity of CC chemokine receptor 5. *Blood* **99**:4298-306.
373. Nguyen, D. H., and D. Taub. 2002. CXCR4 function requires membrane cholesterol: implications for HIV infection. *J. Immunol.* **168**:4121-6.
374. Oberlin, E., A. Amara, F. Bachelierie, C. Bessia, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, O. Schwartz, J. M. Heard, I. Clark-Lewis, D. F. Legler, M. Loetscher, M. Baggiolini, and B. Moser. 1996. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* **382**:833-5.
375. Oberste, M. S., and M. A. Gonda. 1992. Conservation of amino-acid sequence motifs in lentivirus Vif proteins. *Virus Genes* **6**:95-102.
376. O'Doherty, U., W. J. Swiggard, and M. H. Malim. 2000. Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *J. Virol.* **74**:10074-80.
377. Ohno, H., R. C. Aguilar, M. C. Fournier, S. Hennecke, P. Cosson, and J. S. Bonifacino. 1997. Interaction of endocytic signals from the HIV-1 envelope glycoprotein complex with members of the adaptor medium chain family. *Virology* **238**:305-15.
378. Ono, A., and E. O. Freed. 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *PNAS* **98**:13925-30.
379. Oppenheim, J. J., C. O. Zachariae, N. Mukaida, and K. Matsushima. 1991. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:617-48.
380. Orenstein, J. M. 2000. In vivo cytolysis and fusion of human immunodeficiency virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue. *J. Infect. Dis.* **182**:338-42.
381. Orenstein, J. M. 1998. The Warthin-Finkeldey-type giant cell in HIV infection, what is it? *Ultrastruct. Pathol.* **22**:293-303.
382. Ott, D. E. 1997. Cellular proteins in HIV virions. *Rev. Med. Virol.* **7**:167-180.
383. Ott, D. E. 2002. Potential roles of cellular proteins in HIV-1. *Rev. Med. Virol.* **12**:359-74.
384. Ott, D. E., L. V. Coren, E. N. Chertova, T. D. Gagliardi, and U. Schubert. 2000. Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag. *Virology* **278**:111-21.
385. Ott, D. E., L. V. Coren, D. G. Johnson, R. C. Sowder, 2nd, L. O. Arthur, and L. E. Henderson. 1995. Analysis and localization of cyclophilin A found in the virions of human immunodeficiency virus type 1 MN strain. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**:1003-6.
386. Ott, D. E., L. V. Coren, B. P. Kane, L. K. Busch, D. G. Johnson, R. C. Sowder, 2nd, E. N. Chertova, L. O. Arthur, and L. E. Henderson. 1996.

- Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions. *J. Virol.* **70**:7734-43.
387. Ottmann, M., C. Gabus, and J. Darlix. 1995. The central globular domain of the nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus type 1 is critical for virion structure and infectivity. *J. Virol.* **69**:1778-84.
 388. Owman, C., A. Garzino-Demo, F. Cocchi, M. Popovic, A. Sabirsh, and R. C. Gallo. 1998. The leukotriene B4 receptor functions as a novel type of coreceptor mediating entry of primary HIV-1 isolates into CD4-positive cells. *PNAS* **95**:9530-4.
 389. Ozel, M., G. Pauli, and H. R. Gelderblom. 1988. The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch. Virol.* **100**:255-66.
 390. Palese, P., K. Tobita, M. Ueda, and R. W. Compans. 1974. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* **61**: 397-410.
 391. Pantaleo, G., C. Graziosi, J. F. Demarest, L. Butini, M. Montroni, C. H. Fox, J. M. Orenstein, D. P. Kotler, and A. S. Fauci. 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* **362**:355-8.
 392. Parent, L. J., R. P. Bennett, R. C. Craven, T. D. Nelle, N. K. Krishna, J. B. Bowzard, C. B. Wilson, B. A. Puffer, R. C. Montelaro, and J. W. Wills. 1995. Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J. Virol.* **69**:5455-60.
 393. Parolini, I., M. Sargiacomo, M. P. Lisanti, and C. Peschle. 1996. Signal transduction and glycoposphatidylinositol-linked proteins (lyn, lck, CD4, CD45, G proteins, and CD55) selectively localize in Triton-insoluble plasma membrane domains of human leukemic cell lines and normal granulocytes. *Blood* **87**:3783-94.
 394. Pathak, V. K., and W. S. Hu. 1997. "Might as well jump!" Template switching by retroviral reverse transcriptase, defective genome formation, and recombination. *Semin. Virol.* **8**:141-150.
 395. Paul, M., S. Mazumder, N. Raja, and M. A. Jabbar. 1998. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu transmembrane domain that promotes the enhanced release of virus-like particles from the plasma membrane of mammalian cells. *J. Virol.* **72**:1270-1279.
 396. Paxton, W., R. I. Connor, and N. R. Landau. 1993. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J. Virol.* **67**:7229-37.
 397. Pelchen-Matthews, A., R. P. da Silva, M. J. Bijlmakers, N. Signoret, S. Gordon, and M. Marsh. 1998. Lack of p56lck expression correlates with CD4 endocytosis in primary lymphoid and myeloid cells. *Eur. J. Immunol.* **28**:3639-47.
 398. Peng, B., and M. Robert-Guroff. 2001. Deletion of N-terminal myristoylation site of HIV Nef abrogates both MHC-1 and CD4 down-regulation. *Immunol. Lett.* **78**:195-200.

399. Pepin, J., G. Morgan, D. Dunn, S. Gevao, M. Mendy, I. Gaye, N. Scollen, R. Tedder, and H. Whittle. 1991. HIV-2-induced immunosuppression among asymptomatic West African prostitutes: evidence that HIV-2 is pathogenic, but less so than HIV-1. *AIDS* **5**:1165-72.
400. Pettit, S. C., N. Sheng, R. Tritch, S. Erickson-Viitanen, and R. Swanstrom. 1998. The regulation of sequential processing of HIV-1 Gag by the viral protease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **436**:15-25.
401. Piatak, M., Jr., L. C. Yang, K. C. Luk, J. D. Lifson, M. S. Saag, S. J. Clark, J. C. Kappes, B. H. Hahn, and G. M. Shaw. 1993. Viral dynamics in primary HIV-1 infection. *Lancet* **341**:1099.
402. Pickl, W. F., F. X. Pimentel-Muinos, and B. Seed. 2001. Lipid rafts and pseudotyping. *J. Virol.* **75**:7175-83.
403. Piguet, V., Y. L. Chen, A. Mangasarian, M. Foti, J. L. Carpentier, and D. Trono. 1998. Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. *EMBO* **17**:2472-2481.
404. Piguet, V., F. Gu, M. Foti, N. Demareux, J. Gruenberg, J. L. Carpentier, and D. Trono. 1999. Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of b-COP in endosomes. *Cell* **97**:63-73.
405. Piguet, V., O. Schwartz, S. Le Gall, and D. Trono. 1999. The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses; a paradigm for the modulation of cell surface receptors. *Immunol. Rev.* **168**:51-63.
406. Piot, P., T. C. Quinn, H. Taelman, F. M. Feinsod, K. B. Minlangu, O. Wobin, N. Mbendi, P. Mazebo, K. Ndangi, W. Stevens, and et al. 1984. Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire. *Lancet* **2**:65-9.
407. Pleskoff, O., C. Treboute, A. Brelot, N. Heveker, M. Seman, and M. Alizon. 1997. Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science* **276**:1874-8.
408. Pollard, V. W., and M. H. Malim. 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:491-532.
409. Poon, B., K. Grovit-Ferbas, S. A. Stewart, and I. S. Chen. 1998. Cell cycle arrest by Vpr in HIV-1 virions and insensitivity to antiretroviral agents. *Science* **281**:266-9.
410. Poon, D., J. Wu, and A. Aldovini. 1996. Charged amino acid residues of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid p7 protein involved in RNA packaging and infectivity. *J. Virol.* **70**:6607-16.
411. Poon, D. T., L. V. Coren, and D. E. Ott. 2000. Efficient incorporation of HLA class II onto human immunodeficiency virus type 1 requires envelope glycoprotein packaging. *J. Virol.* **74**:3918-23.
412. Popik, W., T. M. Alce, and W. C. Au. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J. Virol.* **76**:4709-22.
413. Popov, S., M. Rexach, L. Ratner, G. Blobel, and M. Bukrinsky. 1998. Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J. Biol. Chem.* **273**:13347-52.

414. Popov, S., M. Rexach, G. Zybarth, N. Reiling, M. A. Lee, L. Ratner, C. M. Lane, M. S. Moore, G. Blobel, and M. Bukrinsky. 1998. Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *EMBO* **17**:909-17.
415. Provitera, P., A. Goff, A. Harenberg, F. Bouamr, C. Carter, and S. Scarlata. 2001. Role of the major homology region in assembly of HIV-1 Gag. *Biochemistry* **40**:5565-72.
416. Purcell, D. F., and M. A. Martin. 1993. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol.* **67**:6365-78.
417. Radu, A., G. Blobel, and M. S. Moore. 1995. Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *PNAS* **92**:1769-73.
418. Raja, N. U., and M. A. Jabbar. 1996. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein tethered to the CD4 extracellular domain is localized to the plasma membrane and is biologically active in the secretory pathway of mammalian cells: implications for the mechanisms of Vpu function. *Virology* **220**:141-51.
419. Rapaport, E., C. R. Casella, Ikl, F. Mustafa, D. Isaak, and T. H. Finkel. 1998. Mapping of HIV-1 determinants of apoptosis in infected T cells. *Virology* **252**:407-17.
420. Raposo, G., M. Moore, D. Innes, R. Leijendekker, A. Leigh-Brown, P. Benaroch, and H. Geuze. 2002. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* **3**:718-29.
421. Ratner, L., W. Haseltine, R. Patarca, K. J. Livak, B. Starcich, S. F. Josephs, E. R. Doran, Rafalski, J. A., E. A. Whitehorn, K. Baumeister, L. Ivanoff, S. R. Petteway, M. L. Pearson, J. A. Lautenberger, T. S. Papas, J. Ghayeb, N. T. Chang, R. C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* **313**: 277-84.
422. Refaeli, Y., D. N. Levy, and D. B. Weiner. 1995. The glucocorticoid receptor type II complex is a target of the HIV-1 vpr gene product. *PNAS* **92**:3621-5.
423. Regier, D. A., and R. C. Desrosiers. 1990. The complete nucleotide sequence of a pathogenic molecular clone of simian immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**:1221-31.
424. Reicin, A. S., A. Ohagen, L. Yin, S. Hoglund, and S. P. Goff. 1996. The role of Gag in human immunodeficiency virus type 1 virion morphogenesis and early steps of the viral life cycle. *J. Virol.* **70**:8645-52.
425. Rein, A., M. R. McClure, N. R. Rice, R. B. Luftig, and A. M. Schultz. 1986. Myristylation site in Pr65gag is essential for virus particle formation by Moloney murine leukemia virus. *PNAS* **83**:7246-50.
426. Reinherz, E. L., and S. F. Schlossman. 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* **19**:821-7.
427. Reiss, P., J. M. Lange, A. de Ronde, F. de Wolf, J. Dekker, C. Debouck, and J. Goudsmit. 1990. Speed of progression to AIDS and degree of antibody response to accessory gene products of HIV-1. *J. Med. Virol.* **30**:163-8.

428. Resh, M. D. 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1451**:1-16.
429. Ritter Jr., G. D., G. Yamshchikov, S. Cohen, and M. J. Mulligan. 1996. Human immunodeficiency virus type 2 glycoprotein enhancement of particle budding: Role of the cytoplasmic domain. *J. Virol.* **70**:2669-73.
430. Rizzuto, C. D., and J. G. Sodroski. 1997. Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization. *J. Virol.* **71**:4847-51.
431. Roe, T., T. C. Reynolds, G. Yu, and P. O. Brown. 1993. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO* **12**:2099-108.
432. Roebuck, K. A., and M. Saifuddin. 1999. Regulation of HIV-1 transcription. *Gene Expr.* **8**:67-84.
433. Rogel, M. E., L. I. Wu, and M. Emerman. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J. Virol.* **69**:882-8.
434. Roper, K., D. Corbeil, and W. B. Huttner. 2000. Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat. Cell. Biol.* **2**:582-92.
435. Rosen, C. A., E. Terwilliger, A. Dayton, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1988. Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *PNAS* **85**:2071-5.
436. Ross, E. K., A. J. Buckler-White, A. B. Rabson, G. Englund, and M. A. Martin. 1991. Contribution of NF-kappa B and Sp1 binding motifs to the replicative capacity of human immunodeficiency virus type 1: distinct patterns of viral growth are determined by T-cell types. *J. Virol.* **65**:4350-8.
437. Ross, T. M., A. E. Oran, and B. R. Cullen. 1999. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr. Biol.* **9**:613-21.
438. Roth, M. J., P. L. Schwartzberg, and S. P. Goff. 1989. Structure of the termini of DNA intermediates in the integration of retroviral DNA: dependence on IN function and terminal DNA sequence. *Cell* **58**:47-54.
439. Rousso, I., M. B. Mixon, B. K. Chen, and P. S. Kim. 2000. Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *PNAS* **97**:13523-5.
440. Rowell, J. F., A. L. Ruff, F. G. Guarnieri, K. Staveley-O'Carroll, X. Lin, J. Tang, J. T. August, and R. F. Siliciano. 1995. Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. *J. Immunol.* **155**:1818-28.
441. Rucker, J., A. L. Edinger, M. Sharron, M. Samson, B. Lee, J. F. Berson, Y. Yi, B. Margulies, R. G. Collman, B. J. Doranz, M. Parmentier, and R. W. Doms. 1997. Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* **71**:8999-9007.

442. Rucker, J., M. Samson, B. J. Doranz, F. Libert, J. F. Berson, Y. Yi, R. J. Smyth, R. G. Collman, C. C. Broder, G. Vassart, R. W. Doms, and M. Parmentier. 1996. Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. *Cell* **87**:437-46.
443. Ryu, S. E., P. D. Kwong, A. Truneh, T. G. Porter, J. Arthos, M. Rosenberg, X. P. Dai, N. H. Xuong, R. Axel, R. W. Sweet, and et al. 1990. Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4. *Nature* **348**:419-26.
444. Sakai, H., R. Shibata, J. Sakuragi, S. Sakuragi, M. Kawamura, and A. Adachi. 1993. Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 Vif protein for maturation of virus particles. *J. Virol.* **67**:1663-1666.
445. Sakalian, M., and E. Hunter. 1998. Molecular events in the assembly of retrovirus particles. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**:329-39.
446. Salzer, U., P. Hinterdorfer, U. Hunger, C. Borken, and R. Prohaska. 2002. Ca(++)-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood* **99**:2569-77.
447. Salzwedel, K., and E. A. Berger. 2000. Cooperative subunit interactions within the oligomeric envelope glycoprotein of HIV-1: functional complementation of specific defects in gp120 and gp41. *PNAS* **97**:12794-9.
448. Salzwedel, K., E. D. Smith, B. Dey, and E. A. Berger. 2000. Sequential CD4-coreceptor interactions in human immunodeficiency virus type 1 Env function: soluble CD4 activates Env for coreceptor-dependent fusion and reveals blocking activities of antibodies against cryptic conserved epitopes on gp120. *J. Virol.* **74**:326-33.
449. Salzwedel, K., J. T. West, M. J. Mulligan, and E. Hunter. 1998. Retention of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum does not redirect virus assembly from the plasma membrane. *J. Virol.* **72**:7523-31.
450. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual., 2 ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.
451. Samson, M., A. L. Edinger, P. Stordeur, J. Rucker, V. Verhasselt, M. Sharron, C. Govaerts, C. Mollereau, G. Vassart, R. W. Doms, and M. Parmentier. 1998. ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur. J. Immunol.* **28**:1689-700.
452. Samson, M., O. Labbe, C. Mollereau, G. Vassart, and M. Parmentier. 1996. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* **35**:3362-7.
453. Samson, M., G. LaRosa, F. Libert, P. Paindavoine, M. Detheux, G. Vassart, and M. Parmentier. 1997. The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity. *J. Biol. Chem.* **272**:24934-41.
454. Samson, M., F. Libert, B. J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C. M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R. J. Smyth, R. G. Collman, R. W. Doms, G. Vassart, and M. Parmentier. 1996. Resistance

- to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**:722-5.
455. Sanz, M. A., L. Perez, and L. Carrasco. 1994. Semliki Forest virus 6K protein modifies membrane permeability after inducible expression in *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* **269**:12106-10.
 456. Sattentau, Q. J., A. G. Dalgleish, R. A. Weiss, and P. C. Beverley. 1986. Epitopes of the CD4 antigen and HIV infection. *Science* **234**:1120-3.
 457. Scarlata, S., L. S. Ehrlich, and C. A. Carter. 1998. Membrane-induced alterations in HIV-1 Gag and matrix protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* **277**:161-9.
 458. Schols, D., R. Pauwels, J. Desmyter, and E. De Clercq. 1992. Presence of class II histocompatibility DR proteins on the envelope of human immunodeficiency virus demonstrated by FACS analysis. *Virology* **189**:374-6.
 459. Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman. 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**:521-9.
 460. Schubert, U., L. C. Anton, I. Bacik, J. H. Cox, S. Bour, J. R. Bennink, M. Orłowski, K. Strebel, and J. W. Yewdell. 1998. CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J. Virol.* **72**:2280-8.
 461. Schubert, U., S. Bour, A. V. Ferrer-Montiel, M. Montal, F. Maldarelli, and K. Strebel. 1996. The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. *J. Virol.* **70**:800-19.
 462. Schubert, U., K. A. Clouse, and K. Strebel. 1995. Augmentation of Virus Secretion by the Human Immunodeficiency Virus type 1 Vpu protein is cell type independent and occurs in cultured Human Primary Macrophages and Lymphocytes. *J. Virol.* **69**:7699-711.
 463. Schubert, U., A. F. Ferrer-Montiel, M. Oblatt-Montal, P. Hinklein, K. Strebel, and M. Montal. 1996. Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its plausible involvement in the regulation of virus release from HIV-1 infected cells. *FEBS lett.* **398**:12-18.
 464. Schubert, U., P. Henklein, B. Boldyreff, E. Wingender, K. Strebel, and T. Porstmann. 1992. The human immunodeficiency virus encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase-2 (CK-2) at positions Ser52 and Ser 56 within a predicted alpha-helix-turn-alpha-helix-motif. *J. Mol. Biol.* **236**:16-25.
 465. Schubert, U., D. E. Ott, E. N. Chertova, R. Welker, U. Tessmer, M. F. Princiotta, J. R. Bennink, H.-G. Krausslich, and J. W. Yewdell. 2000. Proteasome inhibition interferes with Gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *PNAS* **97**:13057-62.
 466. Schubert, U., and K. Strebel. 1994. Differential activities of the human immunodeficiency virus type 1 encoded vpu protein are regulated by phosphorylation and occur in different cellular compartments. *J. Virol.* **68**:2260-71.

467. Schuitemaker, H., M. Koot, N. A. Kootstra, M. W. Dercksen, R. E. de Goede, R. P. van Steenwijk, J. M. Lange, J. K. Schattenkerk, F. Miedema, and M. Tersmette. 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J. Virol.* **66**:1354-60.
468. Schwartz, O., V. Marechal, O. Danos, and J. M. Heard. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J. Virol.* **69**:4053-9.
469. Schwartz, O., V. Maréchal, S. Le Gall, F. Lemonnie, and J. F. Heard. 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.* **2**:338-342.
470. Schwartz, S., B. K. Felber, D. M. Benko, E. M. Fenyo, and G. N. Pavlakis. 1990. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **64**:2519-29.
471. Schwartz, S., B. K. Felber, E. M. Fenyo, and G. N. Pavlakis. 1990. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J. Virol.* **64**:5448-56.
472. Schwartz, S., B. K. Felber, and G. N. Pavlakis. 1992. Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **12**:207-19.
473. Selby, M. J., E. S. Bain, P. A. Luciw, and B. M. Peterlin. 1989. Structure, sequence, and position of the stem-loop in tar determine transcriptional elongation by tat through the HIV-1 long terminal repeat. *Genes Dev.* **3**:547-58.
474. Selig, L., S. Benichou, M. E. Rogel, L. I. Wu, M. A. Vodicka, J. Sire, R. Benarous, and M. Emerman. 1997. Uracil DNA glycosylase specifically interacts with Vpr of both human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus of sooty mangabeys, but binding does not correlate with cell cycle arrest. *J. Virol.* **71**:4842-6.
475. Sen, N., A. R. Spitzer, and A. Chander. 1997. Calcium-dependence of synexin binding may determine aggregation and fusion of lamellar bodies. *Biochem. J.* **322**:103-9.
476. Sharp, P. M., E. Bailes, F. Gao, B. E. Beer, V. M. Hirsch, and B. H. Hahn. 2000. Origins and evolution of AIDS viruses: estimating the time-scale. *Biochem. Soc. Trans.* **28**:275-82.
477. Sharp, P. M., E. Bailes, M. Stevenson, M. Emerman, and B. H. Hahn. 1996. Gene acquisition in HIV and SIV. *Nature* **383**:586-7.
478. Shaw, A. S., K. E. Amrein, C. Hammond, D. F. Stern, B. M. Sefton, and J. K. Rose. 1989. The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell* **59**:627-36.
479. Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, J. D. Choi, and M. H. Malim. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**:646-50.

480. Shugars, D., C. Wild, T. Greenwell, and T. Matthews. 1996. Biophysical characterization of recombinant proteins expressing the leucine zipper-like domain of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41. *J. Virol.* **70**:2982-91.
481. Siegal, F. P., C. Lopez, G. S. Hammer, A. E. Brown, S. J. Kornfeld, J. Gold, J. Hassett, S. Z. Hirschman, C. Cunningham-Rundles, B. R. Adelsberg, and et al. 1981. Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N. Engl. J. Med.* **305**:1439-44.
482. Simm, M., M. Shahabuddin, W. Chao, J. Allan, and D. Volsky. 1995. Aberrant Gag protein composition of a human immunodeficiency virus type 1 vif mutant produced in primary lymphocytes. *J. Virol.* **69**:4582-86.
483. Simmons, A., V. Aluvihare, and A. McMichael. 2001. Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity* **14**:763-77.
484. Simmons, G., D. Wilkinson, J. Reeves, M. Dittmar, S. Beddows, J. Weber, G. Carnegie, U. Desselberger, P. Gray, R. Weiss, and P. Clapham. 1996. Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry. *J. Virol.* **70**:8355-60.
485. Simon, J. H., N. C. Gaddis, R. A. Fouchier, and M. H. Malim. 1998. Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. *Nat. Med.* **4**:1397-400.
486. Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**:569-72.
487. Singer, I. I., S. Scott, D. W. Kawka, J. Chin, B. L. Daugherty, J. A. DeMartino, J. DiSalvo, S. L. Gould, J. E. Lineberger, L. Malkowitz, M. D. Miller, L. Mitnaul, S. J. Siciliano, M. J. Staruch, H. R. Williams, H. J. Zweerink, and M. S. Springer. 2001. CCR5, CXCR4, and CD4 Are Clustered and Closely Apposed on Microvilli of Human Macrophages and T Cells. *J. Virol.* **75**:3779-90.
488. Singh, D. K., C. McCormick, E. Pacyniak, K. Lawrence, S. B. Dalton, D. M. Pinson, F. Sun, N. E. Berman, M. Calvert, R. S. Gunderson, S. W. Wong, and E. B. Stephens. 2001. A simian human immunodeficiency virus with a nonfunctional Vpu (deltavpuSHIV(KU-1bMC33)) isolated from a macaque with neuroAIDS has selected for mutations in env and nef that contributed to its pathogenic phenotype. *Virology* **282**:123-40.
489. Sleckman, B. P., A. Peterson, W. K. Jones, J. A. Foran, J. L. Greenstein, B. Seed, and S. J. Burakoff. 1987. Expression and function of CD4 in a murine T-cell hybridoma. *Nature* **328**:351-3.
490. Sodroski, J., W. C. Goh, C. Rosen, A. Tartar, D. Portetelle, A. Burny, and W. Haseltine. 1986. Replicative and cytopathic potential of HTLV-III/LAV with sor gene deletions. *Science* **231**:1549-53.
491. Sodroski, J., C. Rosen, F. Wong-Staal, S. Z. Salahuddin, M. Popovic, S. Arya, R. C. Gallo, and W. A. Haseltine. 1985. Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science* **227**:171-3.

492. Sova, P., and D. Volsky. 1993. Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and nonpermissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **67**:6322-6.
493. Sparacio, S., U. Zeilfelder, T. Pfeiffer, T. Henzler, and V. Bosch. 2000. Membrane fusion between retroviral particles: host-range extension and vaccine prospects. *Virology* **271**:248-52.
494. Spearman, P., J. J. Wang, N. Vander Heyden, and L. Ratner. 1994. Identification of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein domains essential to membrane binding and particle assembly. *J. Virol.* **68**:3232-42.
495. Srivastava, M., M. Cartas, T. A. Rizvi, S. P. Singh, D. Serio, V. S. Kalyanaraman, H. B. Pollard, and A. Srinivasan. 1999. HIV-1 Gag shares a signature motif with annexin (Anx7), which is required for virus replication. *PNAS* **96**:2704-9.
496. Starcich, B. R., B. H. Hahn, G. M. Shaw, P. D. McNeely, S. Modrow, H. Wolf, E. S. Parks, W. P. Parks, S. F. Josephs, R. C. Gallo, and et al. 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**:637-48.
497. Stein, B. S., S. D. Gowda, J. D. Lifson, R. C. Penhallow, K. G. Bensch, and E. G. Engleman. 1987. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* **49**:659-68.
498. Stephens, E. B., C. McCormick, E. Pacyniak, D. Griffin, D. M. Pinson, F. Sun, W. Nothnick, S. W. Wong, R. Gunderson, N. E. Berman, and D. K. Singh. 2002. Deletion of the vpu sequences prior to the env in a simian-human immunodeficiency virus results in enhanced Env precursor synthesis but is less pathogenic for pig-tailed macaques. *Virology* **293**:252-61.
499. Stevenson, M., C. Meier, A. M. Mann, N. Chapman, and A. Wasiak. 1988. Envelope glycoprotein of HIV induces interference and cytolysis resistance in CD4+ cells: mechanism for persistence in AIDS. *Cell* **53**:483-96.
500. Stewart, S. A., B. Poon, J. B. Jowett, and I. S. Chen. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest. *J. Virol.* **71**:5579-92.
501. Stewart, S. A., B. Poon, J. Y. Song, and I. S. Chen. 2000. Human immunodeficiency virus type 1 vpr induces apoptosis through caspase activation. *J. Virol.* **74**:3105-11.
502. Stoddart, C. A., R. Geleziunas, S. Ferrell, V. Linquist-Stepps, M. E. Moreno, C. Bare, W. Xu, W. Yonemoto, P. A. Bresnahan, J. M. McCune, and W. C. Greene. 2003. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-mediated downregulation of CD4 correlates with Nef enhancement of viral pathogenesis. *J. Virol.* **77**:2124-33.
503. Strebel, K., D. Daugherty, K. Clouse, D. Cohen, T. Folks, and M. A. Martin. 1987. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* **328**:728-30.
504. Strebel, K., T. Klimkait, F. Maldarelli, and M. A. Martin. 1989. Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 vpu protein. *J. Virol.* **63**:3784-91.

505. Strebel, K., T. Klimkait, and M. A. Martin. 1988. A novel gene of HIV-1, *vpu*, and its 16-kilodalton product. *Science* **241**:1221-23.
506. Swanstrom, R., H. E. Varmus, and J. M. Bishop. 1981. The terminal redundancy of the retrovirus genome facilitates chain elongation by reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **256**:1115-21.
507. Tanaka, M., T. Ueno, T. Nakahara, K. Sasaki, A. Ishimoto, and H. Sakai. 2003. Downregulation of CD4 is required for maintenance of viral infectivity of HIV-1. *Virology* **311**:316-25.
508. Tang, S., T. Murakami, B. E. Agresta, S. Campbell, E. O. Freed, and J. G. Levin. 2001. Human immunodeficiency virus type 1 N-terminal capsid mutants that exhibit aberrant core morphology and are blocked in initiation of reverse transcription in infected cells. *J. Virol.* **75**:9357-66.
509. Temin, H. M. 1993. Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *PNAS* **90**:6900-3.
510. Temin, H. M., and S. Mizutani. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**:1211-3.
511. Terhorst, C., A. van Agthoven, E. Reinherz, and S. Schlossman. 1980. Biochemical analysis of human T lymphocyte differentiation antigens T4 and T5. *Science* **209**:520-1.
512. Tersmette, M., R. A. Gruters, F. de Wolf, R. E. de Goede, J. M. Lange, P. T. Schellekens, J. Goudsmit, H. G. Huisman, and F. Miedema. 1989. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J. Virol.* **63**:2118-25.
513. Terwilliger, E. F., E. A. Cohen, Y.-C. Lu, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 *vpu*. *PNAS* **86**:5163-5167.
514. Thali, M., A. Bukovsky, E. Kondo, B. Rosenwirth, C. T. Walsh, J. Sodroski, and H. G. Gottlinger. 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* **372**:363-5.
515. Tiganos, E., J. Friborg, B. Allain, N. Daniel, X.-J. Yao, and E. A. Cohen. 1998. Structural and functional analysis of the hydrophobic-anchor domain of the human immunodeficiency virus type-1 Vpu protein. *J. Virol.* **251**:96-107.
516. Tiganos, E., J. Friborg, B. Allain, N. G. Daniel, X. J. Yao, and E. A. Cohen. 1998. Structural and functional analysis of the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *Virology* **251**:96-107.
517. Tiganos, E., X. J. Yao, J. Friborg, N. Daniel, and E. A. Cohen. 1997. Putative alpha-helical structures in the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein and CD4 are involved in binding and degradation of the CD4 molecule. *J. Virol.* **71**:4452-60.
518. Tindall, B., and D. A. Cooper. 1991. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* **5**:1-14.
519. Tisdale, M., T. Schulze, B. A. Larder, and K. Moelling. 1991. Mutations within the RNase H domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase abolish virus infectivity. *J. Gen. Virol.* **72**:59-66.

520. Tomar, R. H. 1994. Breaking the asymptomatic phase of HIV-1 infection. *J. Clin. Lab. Anal.* **8**:116-9.
521. Tosteson, M. T., M. P. Caulfield, J. J. Levy, M. Rosenblatt, and D. C. Tosteson. 1988. The synthetic precursor specific region of pre-pro-parathyroid hormone forms ion channels in lipid bilayers. *Biosci. Rep.* **8**:173-83.
522. Tremblay, M., S. Meloche, S. Gratton, M. A. Wainberg, and R. P. Sekaly. 1994. Association of p56lck with the cytoplasmic domain of CD4 modulates HIV-1 expression. *EMBO* **13**:774-83.
523. Tremblay, M. J., J.-F. Fortin, and R. Cantin. 1998. The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunology Today* **19**:346-351.
524. Tristem, M., C. Marshall, A. Karpas, and F. Hill. 1992. Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr. *EMBO* **11**:3405-12.
525. Trkola, A., T. Dragic, J. Arthos, J. M. Binley, W. C. Olson, G. P. Allaway, C. Cheng-Mayer, J. Robinson, P. J. Maddon, and J. P. Moore. 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* **384**:184-7.
526. Turner, J. M., M. H. Brodsky, B. A. Irving, S. D. Levin, R. M. Perlmutter, and D. R. Littman. 1990. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* **60**:755-65.
527. Vaishnav, Y. N., and F. Wong-Staal. 1991. The biochemistry of AIDS. *Annu. Rev. Biochem.* **60**:577-630.
528. Veronese, F. D., A. L. DeVico, T. D. Copeland, S. Oroszlan, R. C. Gallo, and M. G. Sarngadharan. 1985. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* **229**:1402-5.
529. VerPlank, L., F. Bouamr, T. J. LaGrassa, B. Agresta, A. Kikonyogo, J. Leis, and C. A. Carter. 2001. Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *PNAS* **98**:7724-9.
530. Vieira, J., E. Frank, T. J. Spira, and S. H. Landesman. 1983. Acquired immune deficiency in Haitians: opportunistic infections in previously healthy Haitian immigrants. *N. Engl. J. Med.* **308**:125-9.
531. Vodicka, M. A. 2001. Determinants for lentiviral infection of non-dividing cells. *Somat. Cell. Mol. Genet.* **26**:35-49.
532. Vodicka, M. A., D. M. Koepp, P. A. Silver, and M. Emerman. 1998. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev.* **12**:175-85.
533. Vogt, V. M. 2000. Ubiquitin in retrovirus assembly: actor or bystander? *PNAS* **97**:12945-7.
534. von Schwedler, U., J. Song, C. Aiken, and D. Trono. 1993. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J. Virol.* **67**:4945-55.
535. Wang, J. H., Y. W. Yan, T. P. Garrett, J. H. Liu, D. W. Rodgers, R. L. Garlick, G. E. Tarr, Y. Husain, E. L. Reinherz, and S. C. Harrison. 1990. Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature* **348**:411-8.

536. Wang, J. K., E. Kiyokawa, E. Verdin, and D. Trono. 2000. The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *PNAS* **97**:394-9.
537. Ward, S. G., K. Bacon, and J. Westwick. 1998. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity* **9**:1-11.
538. Ward, S. G., and J. Westwick. 1998. Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *Biochem. J.* **333**:457-70.
539. Wei, X., S. K. Ghosh, M. E. Taylor, V. A. Johnson, E. A. Emini, P. Deutsch, J. D. Lifson, S. Bonhoeffer, M. A. Nowak, B. H. Hahn, and et al. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**:117-22.
540. Weinberg, J. B., T. J. Matthews, B. R. Cullen, and M. H. Malim. 1991. Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J. Exp. Med.* **174**:1477-82.
541. Weis, K. 1998. Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem. Sciences* **23**:185-9.
542. Weissenhorn, W., L. J. Calder, A. Dessen, T. Laue, J. J. Skehel, and D. C. Wiley. 1997. Assembly of a rod-shaped chimera of a trimeric GCN4 zipper and the HIV-1 gp41 ectodomain expressed in Escherichia coli. *PNAS* **94**:6065-9.
543. Welker, R., H. Kottler, H. R. Kalbitzer, and H. G. Krausslich. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology* **219**:228-36.
544. Willey, R. L., J. S. Bonifacino, B. J. Potts, M. A. Martin, and R. D. Klausner. 1988. Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *PNAS* **85**:9580-4.
545. Willey, R. L., A. Buckler-White, and K. Strebel. 1994. Sequences present in the cytoplasmic domain of CD4 are necessary and sufficient to confer sensitivity to the human immunodeficiency virus type 1 vpu protein. *J. Virol.* **68**:1207-12.
546. Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* **66**:7193-200.
547. Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J. Virol.* **66**:226-34.
548. Willey, R. L., R. A. Rutledge, S. Dias, T. Folks, T. Theodore, C. E. Buckler, and M. A. Martin. 1986. Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *PNAS* **83**:5038-42.
549. Williams, M., J. F. Roeth, M. R. Kasper, R. I. Fleis, C. G. Przybycin, and K. L. Collins. 2002. Direct binding of human immunodeficiency virus type 1 Nef to the major histocompatibility complex class I (MHC-I) cytoplasmic tail disrupts MHC-I trafficking. *J. Virol.* **76**:12173-84.
550. Wills, J. W., and R. C. Craven. 1991. Form, function, and use of retroviral gag proteins. *AIDS* **5**:639-54.

551. Wilson, W., M. Braddock, S. E. Adams, P. D. Rathjen, S. M. Kingsman, and A. J. Kingsman. 1988. HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems. *Cell* **55**:1159-69.
552. Withers-Ward, E. S., J. B. Jowett, S. A. Stewart, Y. M. Xie, A. Garfinkel, Y. Shibagaki, S. A. Chow, N. Shah, F. Hanaoka, D. G. Sawitz, R. W. Armstrong, L. M. Souza, and I. S. Chen. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with HHR23A, a cellular protein implicated in nucleotide excision DNA repair. *J. Virol.* **71**:9732-42.
553. Woerner, A. M., M. Klutch, J. G. Levin, and C. J. Marcus-Sekura. 1992. Localization of DNA binding activity of HIV-1 integrase to the C-terminal half of the protein. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**:297-304.
554. Wray, V., T. Federau, P. Henklein, S. Klabunde, O. Kunert, D. Schomburg, and U. Schubert. 1995. Solution structure of the hydrophilic region of HIV-1 encoded virus protein U (Vpu) by CD and ¹H NMR spectroscopy. *Int. J. Pept. Protein Res.* **45**:35-43.
555. Wray, V., V. Kinder, T. Federau, P. Henklein, B. Bechinger, and U. Schubert. 1999. Solution structure and orientation of the transmembrane anchor domain of the HIV-1 encoded virus protein U by high resolution and solid-state NMR spectroscopy. *Biochemistry* **38**:5272-82.
556. Wu, H., P. D. Kwong, and W. A. Hendrickson. 1997. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* **387**:527-30.
557. Wu, L., N. P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, and J. Sodroski. 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**:179-83.
558. Wu, L., W. A. Paxton, N. Kassam, N. Ruffing, J. B. Rottman, N. Sullivan, H. Choe, J. Sodroski, W. Newman, R. A. Koup, and C. R. Mackay. 1997. CCR5 Levels and Expression Pattern Correlate with Infectability by Macrophage-tropic HIV-1, In Vitro. *J. Exp. Med.* **185**:1681-92.
559. Wu, Y., and J. W. Marsh. 2001. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science* **293**:1503-6.
560. Wyma, D. J., A. Kotov, and C. Aiken. 2000. Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* **74**:9381-7.
561. Yao, X.-J., J. Friborg, F. Checroune, S. Gratton, F. Boisvert, R. P. Sekaly, and E. A. Cohen. 1995. Degradation of CD4 induced by human immunodeficiency virus type Vpu protein: a predicted alpha-helix structure in the proximal cytoplasmic region of CD4 contributes to Vpu sensitivity. *Virology* **209**:615-623.
562. Yao, X. J., S. Garzon, F. Boisvert, W. A. Haseltine, and É. A. Cohen. 1993. The effect of vpu on HIV-1- induced syncytia formation. *J. Acquir. Immun. Def. Synd.* **6**: 135-41.
563. Yao, X. J., H. Gottlinger, W. A. Haseltine, and E. A. Cohen. 1992. Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export. *J. Virol.* **66**:5119-26.

564. Yao, X.-J., A. J. Mouland, R. A. Subbramanian, J. Forget, J. Rougeau, D. Bergeron, and E. A. Cohen. 1998. Vpr stimulates viral expression and induces cell killing in human immunodeficiency virus type 1 infected dividing Jurkat cells. *J. Virol.* **72**:4712-20.
565. Yao, X. J., A. J. Mouland, R. A. Subbramanian, J. Forget, N. Rougeau, D. Bergeron, and E. A. Cohen. 1998. Vpr stimulates viral expression and induces cell killing in human immunodeficiency virus type 1-infected dividing Jurkat T cells. *J. Virol.* **72**:4686-93.
566. Yeager, M., E. M. Wilson-Kubalek, S. G. Weiner, P. O. Brown, and A. Rein. 1998. Supramolecular organization of immature and mature murine leukemia virus revealed by electron cryo-microscopy: implications for retroviral assembly mechanisms. *PNAS* **95**:7299-304.
567. Yoder, K. E., and F. D. Bushman. 2000. Repair of Gaps in Retroviral DNA Integration Intermediates. *J. Virol.* **74**:11191-200.
568. Yu, X., X. Yuan, Z. Matsuda, T. H. Lee, and M. Essex. 1992. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J. Virol.* **66**:4966-71.
569. Yuan, X., X. Yu, T. H. Lee, and M. Essex. 1993. Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor. *J. Virol.* **67**:6387-94.
570. Zaitseva, M., A. Blauvelt, S. Lee, C. K. Lapham, V. Klaus-Kovtun, H. Mostowski, J. Manischewitz, and H. Golding. 1997. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat. Med.* **3**:1369-75.
571. Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier, and P. Charneau. 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**:173-85.
572. Zhang, L., Y. Huang, T. He, Y. Cao, and D. D. Ho. 1996. HIV-1 subtype and second-receptor use. *Nature* **383**:768.
573. Zhang, L., Y. Huang, H. Yuan, S. Tuttleton, and D. D. Ho. 1997. Genetic characterization of vif, vpr, and vpu sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology* **228**:340-9.
574. Zheng YH, Plemenitas A, Fielding CJ, Peterlin BM. 2003. Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeny virions. *PNAS*. **100**:8460-5.
575. Zheng YH, Plemenitas A, Linnemann T, Fackler OT, Peterlin BM. 2001. Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts. *Curr Biol.* **11**:875-9.
576. Zhou, W., L. J. Parent, J. W. Wills, and M. D. Resh. 1994. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J. Virol.* **68**:2556-69.

ANNEXE 1

Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells.

Levesque, K., Zhao, Y.S., Cohen, E.A. 2003.
Journal of Biological Chemistry 278:28346-53.

Vpu Exerts a Positive Effect on HIV-1 Infectivity by Down-modulating CD4 Receptor Molecules at the Surface of HIV-1-producing Cells*

Received for publication, January 12, 2003, and in revised form, April 29, 2003
 Published, JBC Papers in Press, May 13, 2003, DOI 10.1074/jbc.M300327200

Karine Levesque†§¶, Yong-Sen Zhao§¶, and Éric A. Cohen†**

From the Laboratoire de Rétrovirologie Humaine, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Québec H3C 3J7, Canada, ‡Laboratoire de Rétrovirologie Humaine, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Succursale Centre Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada and §Achillion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut 06511

Human immunodeficiency virus, type 1 (HIV-1) encodes three proteins, Nef, Vpu, and gp160, that down-modulate surface expression of the CD4 receptor during viral infection. In the present study, we have investigated the role of CD4 down-modulation in the HIV-1 infection cycle, primarily from the perspective of Vpu function. We report here that, like Nef, Vpu-mediated CD4 degradation modulates positively HIV-1 infectivity. Our data reveal that accumulation of CD4 at the cell surface of Vpu-deficient HIV-1-producing cells leads to an efficient recruitment of CD4 into virions and to an impairment of viral infectivity. This CD4-mediated inhibition of viral infectivity was not observed when a CD4 mutant unable to bind Env gp120 was used or when VSV-G glycoprotein was utilized to pseudotype viruses, suggesting that an interaction between CD4 and gp120 is required for interference. Indeed, protein analysis of Vpu-defective viral particles reveals that CD4 recruitment is associated with an increased formation of gp120-CD4 complexes at the virion surface. Interestingly, we did not detect any difference at the level of total virion-associated Env glycoproteins between wild-type and Vpu-defective virus, indicating that accumulation of CD4 at the cell surface and recruitment of CD4 into Vpu-defective HIV-1 particles exert a negative effect on viral infectivity, most likely by promoting the formation of nonfunctional gp120-CD4 complexes at the virion surface. Finally, we show that both Vpu- and Nef-induced CD4 down-modulation activities are required for production of fully infectious particles in CD4⁺ T cell lines and primary cells, an observation that has clear implications for viral spread *in vivo*.

CD4 is a type 1 integral membrane glycoprotein expressed primarily on the surface of thymocytes, helper T lymphocytes, and, to a lesser extent, on cells of the monocyte/macrophage lineage (1). Besides its role in T cell ontogeny and antigen-specific T-cell activation, CD4 also serves as the primary cellular co-receptor for human immunodeficiency virus, type 1

(HIV-1)¹ viral entry into cells (1). Infection of target cells is initiated by the high affinity interaction (<10 nm) occurring between CD4 and the viral envelope glycoprotein gp120 (2).

Although the CD4 receptor plays a critical role during HIV-1 entry into target cells, it is well established that HIV-1 down-modulates its own receptor at later stages of the infection cycle in productively infected cells. Indeed, HIV-1 encodes three proteins, Vpu, Env, and Nef, that have a profound effect on CD4 catabolism and are involved in the removal of CD4 from the surface of infected cells (3, 4). Early in infection, the Nef protein down-regulates CD4 molecules that are already present at the cell surface by accelerating their endocytosis and subsequent degradation in lysosomes (5–9). At later stages of infection, the envelope gp160 precursor, through its high receptor binding affinity, retains newly synthesized CD4 in the endoplasmic reticulum (ER). These gp160-CD4 complexes not only prevent cell surface expression of CD4 but also block gp160 maturation and trafficking (10–12). The accessory Vpu (viral protein U) regulates the half-life of CD4 molecules complexed to gp160 by selectively inducing their degradation in the ER, thus, presumably, releasing gp160 and permitting its maturation, trafficking, and incorporation into progeny virions (13).

Vpu is an 81-amino acid protein unique to HIV-1 and the closely related simian immunodeficiency virus isolated from chimpanzee (SIV_{cpz}) (14, 15). The *vpu* gene product is a phosphorylated oligomeric type 1 integral membrane protein that is translated from a bicistronic mRNA that also encodes the Env glycoproteins (16). Vpu performs two main functions during the viral life cycle; it enhances the release of virions from infected cells, and it mediates the selective degradation of the CD4 receptor in the ER (17–19). Vpu-mediated CD4 degradation is a multistep process that is triggered by the direct physical binding of Vpu to the cytoplasmic tail of CD4 (20). Mutational studies have revealed that phosphorylation of seryl residues at positions 52 and 56 of Vpu is required to initiate CD4 proteolysis but is not essential for the initial binding of the protein to CD4 (20). Using genetic and biochemical assays, Margottin *et al.* have shown that Vpu connects CD4 to the ubiquitin-proteasome degradative pathway through a direct, phosphoserine-dependent interaction with the F box protein β -TrCP (21). This finding, combined with the demonstrated sensitivity of Vpu-mediated CD4 degradation to proteasome inhibitors, strongly suggests that Vpu targets CD4 to proteolysis by recruiting the ubiquitin-proteasome cytosolic machinery (22).

* This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), the Canadian Foundation for Innovation, and the Fonds pour la Recherche en Santé du Québec (to E. A. C.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Both authors contributed equally to this work.

¶ Recipient of a studentship from the CIHR.

** Recipient of the Canada Research Chair in Human Retrovirology. To whom correspondence should be addressed. Tel.: 514-343-5967; Fax: 514-343-5995; [redacted]

¹ The abbreviations used are: HIV-1, human immunodeficiency virus 1; ER, endoplasmic reticulum; PBS, phosphate-buffered saline; RT, reverse transcriptase; VSV-G, vesicular stomatitis virus glycoprotein-G; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; FCS, fetal calf serum; LTR, long terminal repeat; MAGI, multinuclear activation of β -galactosidase infectivity; FACS, fluorescence-activated cell sorting.

Although recent studies have provided new details on the molecular mechanism underlying the down-modulation of the CD4 receptor, it is still unclear why HIV-1 has evolved multiple mechanisms to remove its receptor from the cell surface. Given such functional convergence, it is tempting to speculate that cell surface CD4 regulation must be an important determinant of viral replication and pathogenesis *in vivo*. Indeed, recent reports have shown that down-regulation of cell surface CD4 by Nef and/or Vpu is important for viral spread (23–26). All of these studies show that high levels of CD4 on the cell surface interfere with the production of infectious HIV-1 particles; however, they propose different mechanisms to account for this inhibition. Ross *et al.* showed that overexpression of CD4 in HIV-1-transfected human embryonic kidney cells (293T) leads to a reduction in the overall amounts of virus released but does not affect the absolute infectivity of released virus (26). This study further reported that this CD4-mediated inhibition of viral release is dependent on the specific interaction between CD4 and the viral envelope glycoproteins and is reversed by Nef expression (26). On the basis of these results, Ross *et al.* (26) proposed that cell surface CD4 interacts with the envelope protein present on budding HIV-1 virions to inhibit viral release. More recently, Bour *et al.* (23) reported that maintenance of CD4 surface expression in HIV-1-transfected HeLa cells inhibited HIV-1 particle release in an Env-independent manner. The finding that CD4 had no significant effect on particle release by a Vpu-deficient virus led these authors to suggest that CD4 acts by inhibiting the particle release-promoting activity of Vpu (23). However, the infectivity of the released particles was not analyzed in this study. In contrast to the latter studies, Lama *et al.* (25) found that expression of high levels of CD4 at the cell surface of 293T cells induced a drastic reduction in the infectivity of released virion by the sequestration of the viral envelope by CD4. Protein analysis of virions released from 293T cells transfected with proviral constructs isogenic except for the expression of Nef or/and Vpu revealed that CD4 could accumulate in viral particles while at the same time blocking incorporation of Env into virions (25). More recently, Cortes *et al.* (24) extended these studies to Jurkat T cell lines and found that physiological levels of surface CD4 interfere in an envelope-dependent manner with the infectivity of released HIV-1 particles.

In the present study, we have investigated the role of CD4 down-modulation in the virus life cycle, primarily from the perspective of Vpu function. We report here that Vpu, like Nef, exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-regulating cell surface CD4. The effect of Vpu on viral infectivity correlates with the protein's ability to degrade CD4 in the ER and with levels of CD4 surface expression in virus-producing cells. Interestingly, accumulation of CD4 at the cell surface of Vpu-deficient HIV-1 producing cells was found to lead to efficient recruitment of CD4 into virions while at the same time promoting the formation of nonfunctional gp120-CD4 complexes at the virion surface. Finally, both Vpu and Nef were found to be required for production of fully infectious HIV-1 particles in CD4⁺ T cell lines and in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), thus suggesting that these accessory proteins, through their ability to down-regulate CD4, are therefore likely to facilitate the spread of HIV-1 *in vivo*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Lines—Human SV40-transformed 293-T fibroblasts and HeLa-CD4-LTR- β -gal cells (27) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) (Dulbecco's modified Eagle's medium plus 10% FCS). The human lymphoid T cell lines MT4, Jurkat low-CD4, and 1G5 were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 1% antibiotics (RPMI plus 10% FCS). Jurkat CD4⁺ and

Jurkat high-CD4 cell lines were maintained in RPMI plus 10% FCS containing Geneticin (500 μ g/ml) or Geneticin (500 μ g/ml) and zeocin (50 μ g/ml) (Invitrogen), respectively, as described (24). The CD4⁺ 1G5 indicator cell line is derived from Jurkat cells and expresses a luciferase reporter gene under the control of the HIV-1 long terminal repeat (LTR) (28). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from volunteers by Ficoll-Paque centrifugation as recommended by the manufacturer (Amersham Biosciences) and washed thoroughly with PBS to remove platelets. Cells were then cultured in the presence of phytohemagglutinin (5 μ g/ml) for 72 h to activate lymphocytes. Following activation, cells were washed with complete media to remove lectins and maintained in RPMI plus 10% FCS supplemented with 20 units/ml interleukin-2 (Roche Applied Science). All cells were cultured at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere.

Plasmid Constructs and Antibodies—SVC MV-CD4, SVC MV-CD4 Δ 32, the CD4⁺ control SVC MVexPA, and SVC MV-VSV-G plasmid constructs were described previously (29). The SVC MV-CD4 Δ CDR2 plasmid, which encodes a CD4 mutant that contains a 7-amino acid deletion (amino acids 43–49) in the CDR2 region, was obtained by cloning the *Hind*III-*Bam*HI fragment of pMNC-CD4 Δ CDR2 (30) into pGEM-7Zf (Promega). The *Xba*I-*Bam*HI fragment of pGEM-7Zf-CD4 Δ CDR2 was then inserted into the *Xba*I-*Bgl*II cloning sites of SVC MVexPA expression vector to generate SVC MV-CD4 Δ CDR2. The proviral HxBH10-*vpu*^{+/+} *lpu*^{+/+} *lpu*^{22/26} constructs were described previously (31). The genotype of these constructs is 5'-LTR-*gag*⁺, *pol*⁺, *vif*⁺, *vpr*⁺, *tat*⁺, *rev*⁺, *vpu*^{+/+}, *env*⁺, *nef*⁺-LTR-3'. The pNL4.3 infectious molecular clone was obtained from the AIDS Research and Reference Reagent Program (32). This provirus encodes all HIV-1 accessory proteins. The pNL4.3-*nef*⁺ proviral construct was described previously (33). The isogenic pNL4.3-*vpu*^{+/+} *nef*^{+/+} proviral constructs were obtained by replacing the *Sal*I-*Bam*HI (nucleotide positions 5785 and 8465, respectively, where +1 is the site of transcription initiation) fragments of pNL4.3-*nef*^{+/+} with the corresponding *Sal*I-*Bam*HI fragment of HxBH10-*vpu*^{+/+}.

The anti-CD4 (OKT4) and anti-p24 monoclonal antibodies were derived from ascitic fluids of Balb/c mice that were injected with the OKT4 or p24 hybridoma (catalog nos. ATCC CRL-8002 and ATCC HB9725, respectively; American Type Culture Collection, Manassas, VA). Rabbit anti-CD4 H-370 polyclonal antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) (catalog no. sc-7219). The anti-HIV-1 serum (162) was obtained from an HIV-1 infected individual whose serum was tested positive for the presence of HIV-1 antibodies by ELISA. Finally, the anti-gp41 monoclonal antibodies were obtained from supernatant of cultured Chessie 8 hybridoma cells (34). The anti-gp120 mouse monoclonal antibody (1D6) (35) and Chessie 8 hybridoma cells were both obtained from the AIDS research and reference reagent program.

Virus Stock Production—HxBH10-*vpu*^{+/+} *lpu*^{+/+} and VSV-G pseudotyped virus stocks were produced by transfecting 5 \times 10⁶ 293T cells with 5 μ g of proviral DNA constructs alone or, in the case of pseudotyping, with 10 μ g of proviral DNA constructs and 10 μ g of SVC MV-VSV-G DNA by the calcium-phosphate method (29). 48–72 h post-transfection, supernatants were collected, clarified by centrifugation at 3,000 rpm for 30 min, and filtered through 0.45- μ m membrane filters. Virions were then sedimented onto a 20% sucrose cushion by ultracentrifugation at 45,000 rpm in a 50.4 rotor type (Beckman) for 2 h at 4 °C. Viral production was then evaluated by performing a standard reverse transcriptase (RT) activity assay in 50 μ l as described previously (31).

Transient Transfections—For the infectivity assays, 293T cells (10⁶) were mock-transfected or co-transfected with 5 μ g of proviral DNA constructs (HxBH10-*vpu*^{+/+}, HxBH10-*vpu*^{+/+}, HxBH10-*vpu*^{22/26}) and 5 μ g of CD4-expressing plasmids (SVC MV-CD4, SVC MV-CD4 Δ 32, or CD4- Δ CDR2). DNA concentration was normalized in each sample by the addition of the SVC MVexPA control plasmid. pNL4.3-*vpu*^{+/+} *nef*^{+/+} virus preparations were produced by transfecting 10 μ g of the corresponding proviral DNA constructs in 2 \times 10⁶ MT4 cells using the DEAE-dextran method (31). Culture supernatants were collected 48–72 h post-transfection as described above for viral production.

Flow Cytometry Analysis—Jurkat T cell lines or transfected 293T cells were washed, harvested in PBS containing 5% FCS, and incubated with OKT4 anti-CD4 monoclonal antibody in 5% FCS-PBS. After 30 min at 4 °C, cells were washed twice in PBS and incubated for another 30 min at 4 °C with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse antibody in 5% FCS-PBS. Cells were then washed twice in PBS and analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur® cytometer (Becton Dickinson). As negative control, cells were stained using fluorescein

isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse antibody only (Becton Dickinson).

Replication Studies and Viral Infections—MT4 cells (10^6) or PBMCs (3×10^6) were infected with equivalent amounts of virus (HxBH10-*vpu*⁺/*vpu*⁻) as determined by RT activity (MT4, 2×10^5 cpm of RT; PBMC, 7.5×10^6 cpm of RT). Following a 4-h adsorption period, cells were washed extensively with PBS and resuspended in 10 ml of RPMI plus 10% FCS. At regular time intervals, cells were recovered by centrifugation and seeded in fresh medium at a concentration between 10^6 and 5×10^6 viable cells/ml. Cell supernatants were analyzed for the presence of virus by performing RT assays as described previously (31). Jurkat T cell lines (CD4⁻, low-CD4, or high-CD4) (3×10^6) were infected with equivalent amounts (3×10^7 cpm of RT) of VSV-G-pseudotyped HxBH10-*vpu*⁺/*vpu*⁻ virus. Following a 4-h adsorption period, cells were washed extensively with PBS and resuspended in 10 ml of RPMI plus 10% FCS. The infectivity of virions released in the supernatant was analyzed 48 h postinfection.

Infectivity Assays—Infectivity of virus present in clarified supernatants was assessed using the multinuclear activation of β -galactosidase infectivity (MAGI) assay (27) or the luciferase infectivity assay (28). Briefly, for the MAGI assay, equal amounts of virus (6×10^5 to 6×10^6 cpm of RT) was used to infect HeLa-CD4-LTR- β -gal cells seeded the previous day in 24-well plates at 3×10^4 cells/well. 48 h postinfection, cells were washed, fixed, and stained as described (27). The number of β -galactosidase-positive blue cells was determined using light microscopy. Each sample was analyzed in duplicate. For the luciferase assay, equal amounts of virus (1 – 5×10^6 cpm of RT) was used to infect 2×10^5 1G5 cells (LTR-luciferase indicator cell line). Immediately after adsorption, cells were thoroughly washed, and neutralizing amounts of anti-CD4 and anti-gp120 antibodies were added to cell supernatant to prevent syncytia formation. 24 h postinfection, AZT was added to a final concentration of $10 \mu\text{M}$ to limit viral production to one infection cycle. 48 h postinfection, cells were harvested and lysed, and a luciferase assay was performed according to the manufacturer's recommendation (Promega).

Western Blot and Co-immunoprecipitation—Supernatants from HIV-1-transfected MT4 cells or from HIV-1/CD4 co-transfected 293T cells were collected and clarified by centrifugation at 3000 rpm. Virions were pelleted from cell-free supernatants by ultracentrifugation onto a 20% sucrose cushion as described above and lysed in radioimmune precipitation buffer (140 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM deoxycholic acid sodium salt, 0.5% SDS, and 1% Nonidet P-40). Similar amounts of virion, normalized by RT activity measurements, were lysed, divided in two equal fractions, and immunoprecipitated using either anti-CD4 (OKT4) monoclonal antibodies or anti-HIV-1 serum (162). Immune complexes were precipitated using protein A-Sepharose beads (Amersham Biosciences), washed extensively, resuspended in reducing sample buffer, and separated by 8 or 12.5% SDS-PAGE. Following electrophoresis, viral proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (0.45- μm pore size; Bio-Rad) by electroblotting for 3 h at 30 V in a Bio-Rad Trans Blot Cell. The membrane was then incubated for 1 h in blocking solution buffer (Tris-buffered saline containing 1% Tween 20 and 5% nonfat dry milk) and incubated for 2 h with either rabbit anti-CD4 (1:500 dilution) or monoclonal antibodies directed against gp120 (1:1000 dilution) or p24 (1:4000 dilution). Bound antibodies were then probed with horseradish peroxidase-linked anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin (used at 1:7500), washed extensively, and revealed using a sensitive enhanced chemiluminescence detection system (ECL detection kit; Amersham Biosciences). For detection of virion-associated gp41 levels, serial dilution of virion lysates were directly separated by PAGE and analyzed by Western blot as described above using monoclonal antibodies directed against gp41 (undiluted culture fluid supernatant).

RESULTS

Vpu-mediated CD4 Degradation Alleviates the Negative Effect of Cell Surface CD4 on Viral Infectivity—Given that Nef-mediated CD4 down-modulation was previously reported to be an important regulator of HIV-1 infection cycle (24–26), we first investigated the effect of cell surface CD4 expression on viral infectivity in 293T cells using proviral constructs isogenic except for Vpu expression. HxBH10-*vpu*⁺ or HxBH10-*vpu*⁻ isogenic virions were produced in 293T cells following co-transfection of the corresponding proviral construct with increasing concentrations of SVCMV-CD4. These proviral constructs are derived from HxBc2 and as such contain a premature stop

codon in Nef (36). 48 h post-transfection, cells and culture supernatants were collected for cell surface CD4 measurement and evaluation of viral infectivity, respectively. As previously reported, the expression of Vpu was found to down-regulate CD4 expression at the cell surface as revealed by FACS analysis (Fig. 1A) (19). The infectivity potential of Vpu⁻ and Vpu⁺ HIV-1 virus produced in each cell culture was then evaluated by MAGI assay using equivalent amounts of virus as measured by reverse transcriptase activity. The results of Fig. 1B clearly show that CD4 expression exerted an inhibitory effect on HIV-1 infectivity that was directly proportional to cell surface CD4 expression levels. Interestingly, the negative effect of CD4 on viral infectivity was more pronounced (2–7-fold) with Vpu-defective HIV virus than with Vpu⁺ virus. In contrast, the infectivity potential of Vpu⁺ and Vpu⁻ viruses produced from CD4⁻ 293T cells was found to be similar (Fig. 1, C and D). To further confirm the infectivity data obtained using the MAGI assay, we tested the infectivity of Vpu⁺ or Vpu⁻ virus produced in mock- or CD4-transfected 293 T cells using the 1G5 indicator (luciferase) CD4⁺ T cell line. As shown in Fig. 1C, we found that the infectivity potential of Vpu⁺ and Vpu⁻ virus produced in CD4⁻ cells was almost identical, whereas it differed substantially when viruses were produced in the presence of CD4. In the latter case, Vpu-defective virus displayed an infectivity potential that was ~4-fold lower than Vpu⁺ virus. Furthermore, we extended these analyses to Jurkat T cell lines expressing different levels of cell surface CD4 (Fig. 1E). Data presented in Fig. 1F clearly confirm that Vpu alleviates the negative effect of cell surface CD4 on viral infectivity in Jurkat T cell lines expressing different levels of cell surface CD4.

To examine whether Vpu-mediated CD4 degradation was directly responsible for modulating positively viral infectivity in CD4-expressing cells, we tested mutant forms of Vpu or CD4 whose phenotypes were associated with a Vpu-mediated CD4 degradation impairment. The HxBH10-*vpu*^{52/56} provirus encodes a mutant Vpu protein that harbors substitution mutations at both Ser-52 and Ser-56 phosphoacceptor sites. This Vpu mutant is unable to mediate CD4 proteolysis (31). CD4 Δ 32 is a CD4 cytoplasmic domain deletion mutant that is expressed at high levels on the cell surface and is not sensitive to Vpu-mediated CD4 degradation (37). HxBH10-*vpu*⁺, HxBH10-*vpu*⁻, or HxBH10-*vpu*^{52/56} proviral constructs were co-transfected with SVCMV-CD4, SVCMV-CD4 Δ 32, or control plasmids in 293 T cells. 48 h post-transfection, viruses were collected, and MAGI assays were performed as described under "Experimental Procedures." Fig. 1D shows that Vpu⁻, Vpu⁺, or Vpu^{52/56} HIV-1 particles produced in the absence of CD4 all exhibit similar infectivity potential. Interestingly, in the presence of wild type CD4, the number of β -galactosidase-positive cells obtained upon infection with the Vpu^{52/56} virus was reduced considerably as compared with the Vpu⁺ virus. Indeed, the infectivity potential of the the Vpu^{52/56} was comparable with that of the Vpu⁻ virus. Moreover, both Vpu⁻ and Vpu⁺ HIV-1 virus produced in 293T cells expressing CD4 Δ 32 displayed a drastic decrease in infectivity (Fig. 1D), thus further supporting the importance of down-regulating CD4 to obtain infectious viral particles in CD4-expressing cells. Taken together, these results confirm that cell surface CD4 expression exerts a negative effect on the infectious potential of nascent HIV-1 virus produced from CD4-expressing cells and show that Vpu-mediated CD4 degradation alleviates the negative effect of cell-surface CD4 on viral infectivity.

Vpu Modulates Positively the Infectivity of HIV-1 Particles Produced in T Cell Lines and PBMCs—To investigate whether Vpu can modulate the infectivity of HIV-1 particles released from cells expressing physiological levels of surface CD4, we

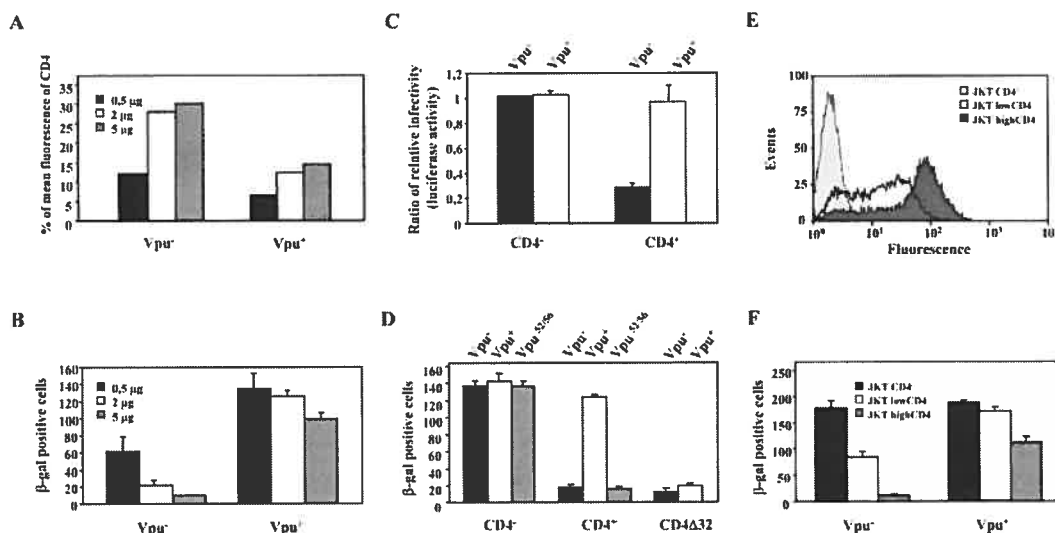


FIG. 1. Vpu-mediated cell surface CD4 down-modulation exerts a positive effect on HIV-1 infectivity. A and B, effect of Vpu on HIV-1 infectivity in CD4-transfected 293T cells. 293T cells were cotransfected with HxBH10-*vpu*⁺ (*Vpu*⁺) or HxBH10-*vpu*⁻ (*Vpu*⁻) proviral constructs and increasing concentrations of SVCMV-CD4 (*CD4*⁺). Cells and culture supernatants were collected for further analysis 48 h post-transfection. A, transfected 293T cells were stained with OKT4 anti-CD4 monoclonal antibody, and the level of cell surface CD4 was quantitatively evaluated by FACS analysis. B, the infectivity of virus produced in each cell culture was evaluated by MAGI assay. HeLa-CD4- β -gal cells were infected with equivalent amounts of virus as determined by RT activity (4×10^6 cpm of RT). Infected cells were fixed and stained with X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) 48 h postinfection. The number of HIV-1-infected positive cells was monitored by counting β -galactosidase-positive cells, which stain in blue. These data are representative of the results obtained in at least two independent experiments. C, luciferase-based infectivity assay. Infectivity of virus preparations, produced as described above, was determined by infecting 1G5-luciferase indicator T cells. Data are expressed as ratios of relative infectivity, where *Vpu*⁻ HIV-1 infectivity was arbitrarily given a value of 1. These data are representative of the results obtained in at least four independent experiments. D, Vpu-mediated CD4 degradation modulates positively HIV-1 infectivity in CD4-expressing cells. HxBH10-*vpu*⁺ (*Vpu*⁺), HxBH10-*vpu*⁻ (*Vpu*⁻), or HxBH10-*vpu*^{Δ32/Δ32} (*Vpu*^{Δ32/Δ32}) were cotransfected with SVCMV-CD4wt (*CD4*⁺) or SVCMV-CD4Δ32 (*CD4*^{Δ32}) or control (*CD4*⁻) plasmids in 293T cells. 48 h post-transfection, supernatants were collected, and virus production was determined by RT activity measurements. The infectivity of virus produced in each cell culture was evaluated by MAGI assay. These data are representative of the results obtained in at least three independent experiments. E and F, effect of Vpu on HIV-1 infectivity in Jurkat T cell lines expressing different levels of cell surface CD4. E, uninfected Jurkat T cell lines (*CD4*⁺, *low-CD4*, or *high-CD4*) were stained with OKT4 anti-CD4 monoclonal antibody, and levels of cell surface CD4 were quantitatively evaluated by FACS analysis. F, Jurkat T cell lines were infected with VSV-G-pseudotyped-HxBH10-*vpu*⁺ or HxBH10-*vpu*⁻ virus. 48 h postinfection, culture supernatants were collected, and the infectivity of virus produced in each cell culture was evaluated by MAGI assay. These data are representative of the results obtained in at least two independent experiments.

analyzed the infectious potential of *Vpu*⁺ and *Vpu*⁻ isogenic viruses produced upon infection of the human MT4 CD4⁺ T cell line and PBMCs isolated from two different donors. The viruses used to perform the replication kinetics in MT4 cells and PBMCs were produced following transfection of 293T cells with HxBH10-*vpu*⁺ and HxBH10-*vpu*⁻. As previously reported, MT4 cells and PBMCs, infected with HIV-1 *Vpu*⁺ viruses released 2–8 times more virus than HIV-1 *Vpu*⁻ infected cell cultures at the peak of viral production (Fig. 2, A–C) (38). At various time intervals during the replication kinetics, cell-free supernatants were collected from each infected culture, and the infectivity potential of the containing virus was determined by MAGI assay using the same amount of virus as determined by RT activity. We consistently observed that *Vpu*⁻ virus produced in MT4 (Fig. 2D) and Jurkat (data not shown) CD4⁺ T cell lines as well as in PBMCs (Fig. 2, E and F) exhibited a substantial impairment of their infectious potential as compared with their *Vpu*⁺ isogenic counterparts. This impairment of viral infectivity resulting from the lack of Vpu expression ranged approximately from 2- to 10-fold at the peak of viral replication depending on the donor or the tested T cell line. From these results, we conclude that Vpu modulates positively the infectious potential of HIV-1 virions produced from both CD4⁺ T cell lines and primary PBMCs.

Incorporation of CD4 into Virions Interferes with the Level of

Functional Envelope Associated with HIV-1 Viral Particles—To understand the molecular mechanism underlying cell surface CD4-mediated inhibition of HIV-1 infectivity, we performed a detailed protein analysis of viral particles released from CD4-expressing 293T cells and investigated whether (i) CD4 molecules were incorporated into HIV-1 virions and (ii) modulation of cell surface CD4 by Vpu influenced the levels of CD4 molecules and HIV-1 Env glycoproteins incorporated into virions. 293T cells were co-transfected with SVCMV-CD4 or control plasmids and HxBH10-*vpu*⁻ or HxBH10-*vpu*⁺ proviral constructs. 48 h post-transfection, cell-free supernatants were collected for viral infectivity determination by MAGI assay or sedimented by ultracentrifugation to isolate HIV-1 virions. Pelleted virions were lysed in radioimmune precipitation buffer and divided into two equal fractions that were immunoprecipitated with either anti-CD4 monoclonal antibodies (OKT4) or anti-HIV-1 human serum. Immunocomplexes were then separated on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane for Western blot analysis using specific antibodies including anti-CD4, anti-gp120 monoclonal antibodies, or anti-p24. The results of Fig. 3A clearly show that CD4 molecules are incorporated into viral particles released from CD4-expressing 293 T cells (Fig. 3A, lanes 5–6, total CD4). Lack of CD4 detection in the supernatant of CD4-expressing 293 T cells rules out the possibility that CD4 associated with viral particles might

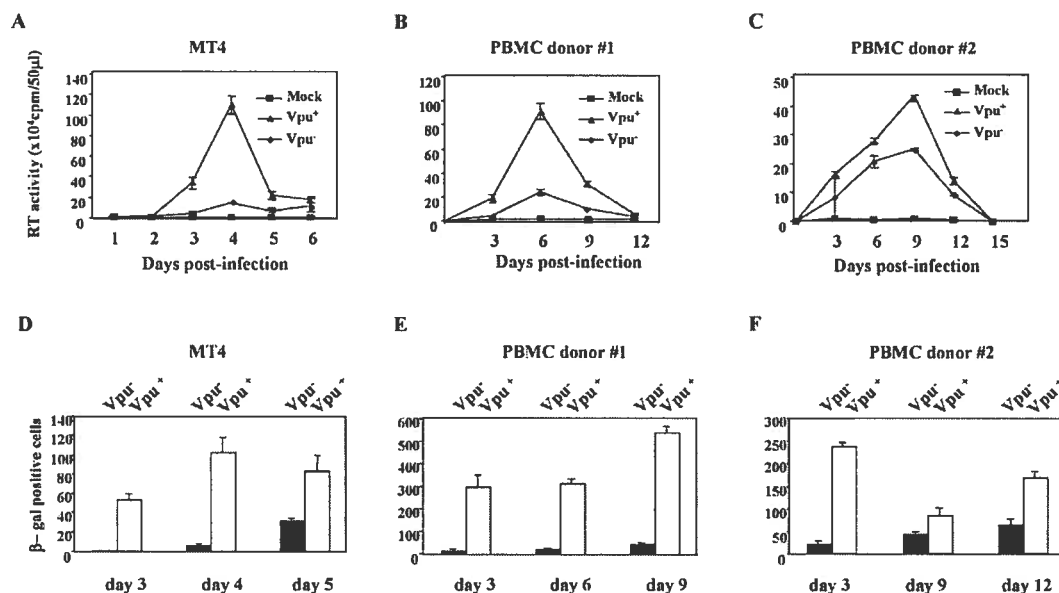


FIG. 2. Vpu modulates positively the infectivity of HIV-1 virions produced in MT4 cells and primary PBMCs. MT4 cells (A and D) and PBMCs isolated from two distinct donors (B and C, E and F) were mock-infected (■) or infected with equivalent amounts of HxBH10-*vpu*⁻ (▲) or HxBH10-*vpu*⁺ (◆) virus. At different time intervals following infection, culture supernatants were collected. Viral production and infectivity were evaluated in duplicates using RT activity measurements (A–C) or the MAGI assay (D–F). These data are representative of the results obtained in at least three independent experiments.

originate from cell microvesicle contamination (Fig. 3A, lane 2, Total CD4). Substantial amounts of CD4 molecules were incorporated into HIV-1 Vpu-defective virions, whereas levels of CD4 molecules associated with HIV-1 particles were drastically reduced in the presence of Vpu (Fig. 3A, compare lanes 5 and 6, Total CD4). Similar results were obtained when virus produced from MT4 CD4⁺ T cell lines were analyzed for endogenous CD4 virion incorporation (Fig. 4A, compare lanes 2 and 3). Interestingly, CD4 recruitment into virion was found to be independent of CD4-gp120 interaction, since CD4 was packaged into viral particles produced from an Env-defective proviral construct, and CD4-ΔCDR2, a CD4 mutant unable to bind gp120 (30), was still found to be incorporated into viral particle when coexpressed with Vpu⁻ proviral constructs in 293T cells (data not shown). Interestingly, Vpu-mediated reduction of virion-associated CD4 molecules was shown to correlate with an enhancement of viral infectivity (Fig. 3C, compare Vpu⁻/CD4⁺ with Vpu⁺/CD4⁺). Moreover, Fig. 3C reveals that the viral infectivity impairment observed in the absence of Vpu results from CD4 molecules that have the ability to bind gp120. Indeed, the gp120-binding CD4 mutant, CD4ΔCDR2 (30), does not impair the infectivity of Vpu⁻ virus although CD4ΔCDR2 is expressed at the cell surface and is incorporated in substantial amounts in Vpu⁻ virion (data not shown). This observation is further supported by the data of Fig. 3D, which shows that VSV-G-pseudotyped Vpu-defective HIV-1 virions produced in the presence or absence of wild type CD4 exhibit comparable viral infectivity, although CD4 incorporation in VSV-G pseudotyped virus or wild type virus was found to be comparable (data not shown). These results suggest that the negative effect of CD4 on viral infectivity involves recruitment of CD4 molecules into virions and requires an interaction between CD4 and gp120.

To further explore the molecular mechanism underlying the

effect of Vpu-mediated CD4 degradation on viral infectivity, we next determined whether Vpu expression influenced the levels of Env glycoproteins incorporated into virions released from CD4-expressing 293T cells or MT4 T cells. Figs. 3, A and B, and 4B reveal that Vpu does not influence the levels of Env glycoproteins associated with progeny HIV-1 particles, since the amount of virion gp41 or gp120 was similar in the presence or absence of Vpu (Fig. 3A, lanes 5 and 6 (Total Env), and Fig. 3B or 4B, compare lanes 4–6 with lanes 1–3). As previously reported by Lama *et al.* (25), levels of virion-associated gp120 were consistently higher in virion produced from 293 T cells (CD4⁺) than in virus produced from CD4-expressing 293T cells (Fig. 3A, compare lanes 3 and 4 with lanes 5 and 6, Total Env). This effect was independent of Vpu expression and probably reflects the previously reported CD4-mediated gp160 retention that occurs in the ER, which is known to reduce Env trafficking and presumably incorporation in progeny viral particles (13). These results indicate that Vpu-mediated CD4 degradation does not lead to more Env glycoproteins being incorporated into HIV-1 virions, and consequently, the negative effect of CD4 on viral infectivity, in our experimental conditions, cannot be explained by a reduction of envelope incorporation into virions.

We next investigated whether virion-associated CD4 molecules might interfere with Env function by diminishing the ability of incorporated Env glycoproteins to bind CD4 molecules at the surface of target cells. Specifically, we evaluated whether a percentage of virion-associated gp120 or CD4 was complexed to each other and whether Vpu expression could modulate the amount of such gp120-CD4 complexes. Virion-associated gp120-CD4 complexes were isolated by co-immunoprecipitation using anti-HIV-1 or anti-CD4 (OKT4) antibodies and analyzed for the presence of bound-CD4 or bound-gp120 by Western blot using anti-CD4 or anti-gp120 monoclonal antibodies. The data of Fig. 3A reveal that in the absence of Vpu

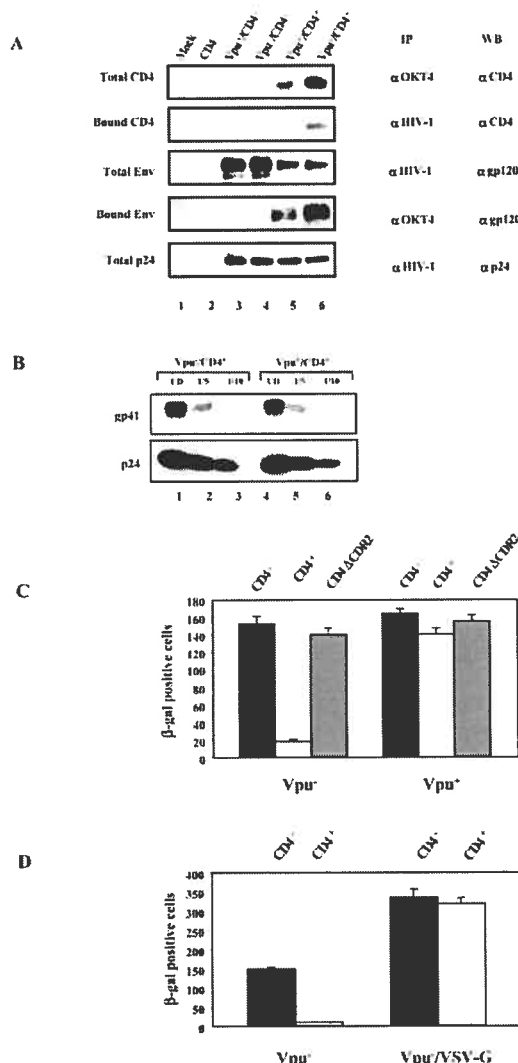


FIG. 3. Down-regulation of CD4 cell surface expression and packaging into HIV-1 particles enhances viral infectivity by augmenting functional Env glycoproteins levels at the virion surface. A, CD4 molecules are incorporated into HIV-1 particles during viral morphogenesis. HxBH10-*vpu*⁻ (*Vpu*⁻) or HxBH10-*vpu*⁺ (*Vpu*⁺) was cotransfected with SVCMV-CD4wt (CD4wt) or control plasmids (CD4⁻) in 293T cells. Virions were pelleted down from cell free supernatants by ultracentrifugation and normalized for RT activity. Virions were then lysed, divided into two equal fractions, and immunoprecipitated (IP) with either anti-CD4 monoclonal antibody (α OKT4) or anti-HIV-1 serum (α HIV-1). Immunocomplexes were separated by gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose, and analyzed by Western blot (WB) using anti-CD4 (α CD4) polyclonal antibodies or anti-gp120 (α gp120) monoclonal antibodies or anti-p24 monoclonal antibodies (α p24) as indicated. Results shown for bound Env and total Env were obtained using different film exposure and accordingly cannot be compared. B, effect of CD4 cell surface expression on gp41 incorporation into viral particles. Virion prepared from transfected 293T cells were lysed in radioimmune precipitation buffer. Serial dilutions of viral lysates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and analyzed by Western blot, using anti-gp41 monoclonal antibodies or anti-p24 serum. UD, undiluted. C, effect of CD4 cell surface expression on viral infectivity. Cell-free supernatants prepared as described above

(*Vpu*⁻), a fraction of gp120 molecules is complexed with CD4, and inversely, a fraction of CD4 molecules is found associated with gp120 (lane 6, *Bound CD4*, *Bound gp120*). Expression of *Vpu* was shown to reduce the formation of gp120-CD4 complexes given that upon overexposure of the autoradiogram, a clear difference in bound gp120 was detected in the presence and absence of *Vpu* (compare lanes 5 and 6, *Bound gp120*; results shown for bound Env and total Env were obtained using different film exposure and accordingly cannot be compared). Moreover, using autoradiogram exposure time similar to total CD4, we were unable to detect bound CD4 signal in presence of *Vpu* (compare lanes 5 and 6, bound CD4). These results suggest that recruitment of CD4 into the virion affects viral infectivity by forming complexes with gp120 at the virion surface, thereby saturating CD4 binding sites on gp120 molecules and decreasing the levels of functional Env glycoproteins at the virion surface. Thus, *Vpu*, by reducing CD4 cell surface expression and packaging into virion, inhibits this process and consequently permits the release of infectious particles.

Vpu- and Nef-induced CD4 Down-modulation Activities Are Required for Optimal HIV-1 Infectivity—Both *Vpu* and *Nef* down-modulate surface expression of the CD4 receptor during HIV-1 infection (6). To investigate their relative contributions to HIV-1 infectivity, we transfected CD4⁺ MT4 T cells with proviral constructs isogenic except for the expression of *Vpu* or/and *Nef*. 3 days post-transfection, the infectivity of virions produced in the culture supernatants was evaluated by MAGI assay using equivalent amounts of virus as determined by RT activity. Results of Fig. 5 indicate that the absence of either *Vpu* or *Nef* decreases viral infectivity by 4-fold as compared with wild type virus. Interestingly, the effect of *Vpu* and *Nef* on viral infectivity appears to be synergistic rather than additive, since HIV-1 virus produced in the absence of both *Vpu* and *Nef* displayed a 20–30-fold decrease in viral infectivity as compared with wild type virus. This finding indicates that cell surface CD4 down-modulation mediated by *Vpu* and *Nef* during HIV-1 viral infection is required for optimal viral infectivity.

DISCUSSION

HIV-1 *Vpu* is associated with two biological activities during HIV-1 infection; (i) it facilitates the release of nascent viral particles by a mechanism that is independent of CD4 and Env glycoprotein expression (17, 39), and (ii) it mediates the specific degradation of the CD4 receptor in the ER (19). Although *Vpu*-mediated enhancement of viral release has an obvious role during HIV-1 infection (to increase viral spread), the role of *Vpu*-mediated CD4 degradation still remains unclear. This effect of *Vpu* on CD4 must confer a selective advantage to the virus, since HIV-1 encodes two other proteins, *Nef* and the Env precursor gp160, that also contribute to CD4 down-modulation by acting at distinct steps of the infection cycle. Several hypotheses have been proposed to explain the functional significance of HIV-1-induced CD4 down-regulation. First, elimination of the primary receptor from the cell surface might prevent cytopathic effects induced by multiple superinfections (40). Al-

were collected, and virus production was determined by RT activity measurements. The infectivity of virus produced in each cell culture was evaluated by MAGI assay. These data are representative of the results obtained in at least four independent experiments. D, effect of CD4 cell surface expression on the infectivity of VSV-G-pseudotyped HIV-1 *Vpu*⁻ particles. HxBH10-*vpu*⁻ and SVCMV-CD4 (CD4⁺) or control plasmid (CD4⁻) were cotransfected with or without SVCMV-VSV-G in 293T cells. Supernatants were collected, and virus production was determined by RT activity measurements 48 h post-transfection. The infectivity of virus produced in each cell culture was evaluated by MAGI assay. These data are representative of the results obtained in at least three independent experiments.

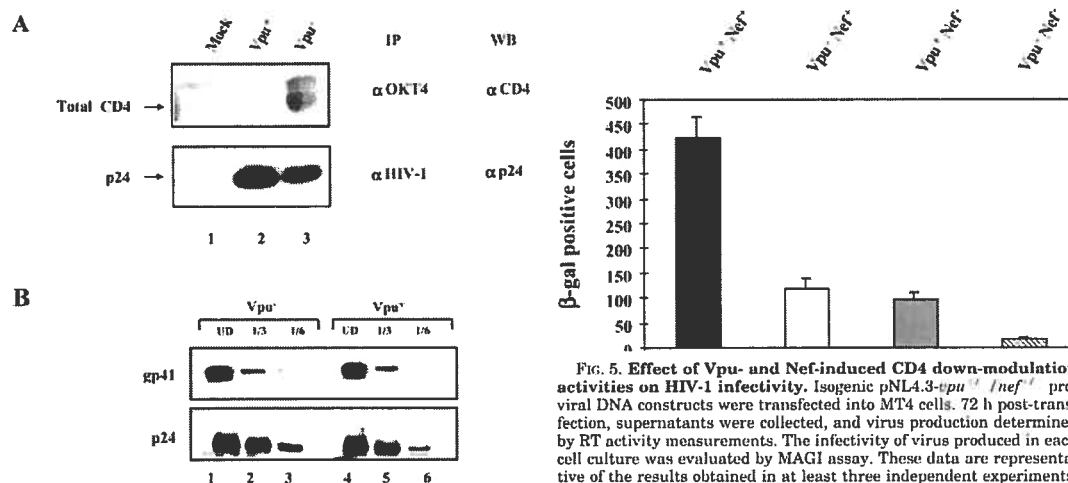


FIG. 4. Protein analysis of HIV-1 particles produced from MT4 T cells. HxBH10-*vpu*⁺ (*Vpu*⁺) or HxBH10-*vpu*⁻ (*Vpu*⁻) were transfected into MT4 CD4⁺ T cell line. At day 2, virions were pelleted down from cell-free supernatants by ultracentrifugation, normalized by RT activity, and lysed in radioimmune precipitation buffer. **A**, virion lysates were divided in two equal fractions and immunoprecipitated (IP) with either anti-CD4 monoclonal antibody (α OKT4) or anti-HIV-1 serum (α HIV-1). Immunocomplexes were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and analyzed by Western blot (WB) using anti-CD4 (Total CD4) or anti-p24 serum (p24) as indicated. **B**, serial dilutions of virion lysates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and analyzed by Western blot using anti-gp41 monoclonal antibodies or anti-p24 serum. UD, undiluted.

ternatively, CD4 down-modulation might prevent the trapping and aggregation of nascent progeny virion at the cell surface, an effect reminiscent of the function of the influenza virus neuraminidase protein (41).

In the present study, we provide evidence showing that Vpu-mediated CD4 degradation allows the release of fully infectious viral particles, since excessive levels of CD4 molecules on the cell surface of virus-producing cells result in incorporation of these molecules into nascent viral particles. Accumulation of CD4 molecules at the cell surface and packaging into Vpu-defective HIV-1 viral particles is shown to have a deleterious effect on viral infectivity as a result of increased formation of gp120-CD4 complexes at the virion surface, thus leading to virion with reduced levels of functional Env glycoproteins. This study provides a functional link between Vpu-mediated CD4 degradation and the HIV-1 infection cycle and pathogenesis, since the positive effect of Vpu on viral infectivity directly correlates with its ability to initiate CD4 degradation.

Much evidence indicates that the effect of Vpu on viral infectivity is intimately correlated with cell surface expression of the CD4 receptor. First, Vpu-defective viruses do not display an impairment of their infectious potential in cells lacking CD4 expression (Fig. 1, C, D, and F). Furthermore, the inhibitory effect of CD4 on Vpu-defective HIV-1 infectivity is dose-dependent and is directly proportional to the levels of cell surface CD4 (as shown in Fig. 1, A–B and E–F). Moreover, we found that a mutant form of CD4 that is not sensitive to Vpu-mediated degradation did inhibit HIV-1 infectivity. Likewise, a Vpu mutant that is unable to degrade CD4 could not restore viral infectivity to wild type levels. These results directly link the effect of Vpu on viral infectivity with the ability of the protein to mediate CD4 degradation (Fig. 1D). Importantly, our results provide evidence that this effect is not limited to cells overex-

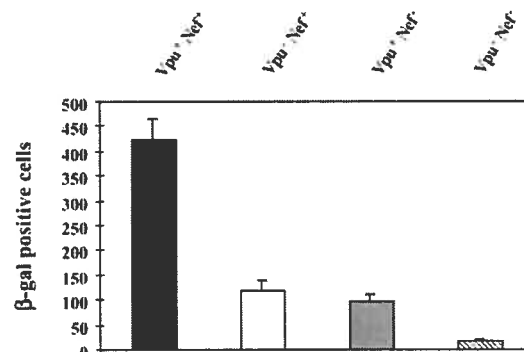


FIG. 5. Effect of Vpu- and Nef-induced CD4 down-modulation activities on HIV-1 infectivity. Isogenic pNL4.3-*vpu*⁺/*nef*⁺ proviral DNA constructs were transfected into MT4 cells. 72 h post-transfection, supernatants were collected, and virus production determined by RT activity measurements. The infectivity of virus produced in each cell culture was evaluated by MAGI assay. These data are representative of the results obtained in at least three independent experiments.

pressing CD4, such as CD4-transfected 293T cells, since it can be observed in MT4 and Jurkat CD4⁺ T cell lines as well as in primary PBMCs, thus confirming the *in vivo* relevance of this phenomenon at CD4 expression levels that accurately reflect the physiological level found on HIV-1-infected host cells. Surprisingly, although the infectivity potential of Vpu-defective virus was significantly reduced (Fig. 2) as compared with Vpu⁺ virus, a delay in the apparition of peak of virus production during replication kinetic studies could not be observed. Indeed, if the role of Vpu is to enhance viral infectivity, one would expect to observe a replication kinetic delay between Vpu⁻ and Vpu⁺ viruses. The failure of Vpu-defective virus to replicate more slowly than Vpu⁺ virus may be due to the fact that their viral propagation occurs primarily by cell-to-cell contact rather than through free virus in tissue culture systems. Interestingly, a recent study has shown that Vpu-defective virus propagates more efficiently by cell-to-cell transmission than virus expressing a wild-type Vpu (42). This enhanced transmission of HIV-1 Vpu-defective virus by cell to cell transfer might compensate for their infectivity impairment and consequently result in replication kinetics very similar to wild-type HIV-1. Consequently, given that the effect of Vpu on viral infectivity was observed in different experimental settings (transfected cells, T cell lines, and primary cells), it is tempting to speculate that the role of Vpu in HIV-1 infection is to enhance the release of fully infectious progeny virions, thus facilitating not only viral spread within a host but also horizontal transmission.

The degradation of the CD4 receptor by HIV-1 Vpu was thought to enhance the release of Env glycoproteins from the ER and their subsequent maturation, trafficking, and incorporation into nascent viral particles (13). Our data show that the effect of Vpu on viral infectivity correlates with decreased levels of CD4 molecule expressed at the cell surface and packaged into viral particles rather than with increased levels of Env incorporated into virions. In fact, although Vpu⁺ or Vpu⁻ viruses display differences in their infectivity potential, the levels of gp41 associated with both viruses remain comparable (Figs. 3B and 4B). These results do not rule out the possibility that Vpu-mediated CD4 degradation might enhance the release of the Env precursor from the ER as previously reported (13). However, this efficient release of Env that presumably takes place with Vpu⁺ virus does not translate into more Env glycoproteins being incorporated into nascent viral particles. Moreover, these data indicate that the infectivity impairment

observed with Vpu-defective virus does not result from fewer envelope glycoproteins being incorporated into virions.

Our results are in agreement with recent reports, which showed, using virus isogenic for the expression of Nef and/or Vpu, that high levels of CD4 on the cell surface interfere with the production of infectious HIV-1 particles from infected cells (24, 25). However, the mechanism they propose to account for this inhibition differs from the one suggested by the present study. They show that in the presence of high levels of surface CD4, released virus incorporates CD4 and displays a substantial reduction of Env glycoprotein levels presumably by a sequestering effect of the viral Env glycoprotein by CD4. Whereas the effect of Nef on Env incorporation was obvious from these studies, the effect of Vpu appeared less pronounced. Using Nef-defective proviral constructs isogenic except for the expression of Vpu, we failed to observe such a block in Env incorporation in Vpu-defective virion, suggesting that the mechanisms by which Nef and Vpu contribute to viral infectivity may be distinct but complementary. It has been reported that HIV-1 Env undergoes rapid endocytosis using clathrin adaptor molecules (43). The same endocytic machinery is targeted by Nef to mediate CD4 internalization (44). It is therefore possible that the higher level of virion-associated Env detected in the presence of Nef could be the result of Nef redirecting the endocytic machinery to down-modulate CD4 cell surface expression, thereby diminishing Env endocytosis and allowing more Env incorporation into HIV-1 particles. Experiments aimed at analyzing the specific contribution of Nef and Vpu mediated CD4 down-modulation on Env function are currently under way.

The effect of Vpu on viral infectivity is strongly correlated with the ability of CD4 molecules to bind gp120. Indeed, cell surface expression and incorporation of a mutant form of CD4, unable to bind gp120, do not impair the infectivity of Vpu-defective virus (Fig. 3C). Incorporation of CD4 molecules *per se* into virion does not appear to impair viral infectivity by affecting the architecture of the virus, since pseudotyping of Vpu-defective virus with VSV-G glycoproteins fully restores viral infectivity (Fig. 3D). The most obvious model emerging from our data would be that recruitment of CD4 into virion affects viral infectivity by forming complexes with gp120 at the virion surface, thereby saturating CD4 binding sites on gp120 molecules and decreasing the levels of functional Env glycoproteins at the virion surface. Vpu, by diminishing CD4 cell surface expression and packaging into virion, reduces this interference and allows release of viral particles harboring functional Env glycoprotein capable of binding CD4 molecules at the surface of target cells. Finally, although our data clearly indicate that cell surface CD4 down-modulation by Nef and Vpu during HIV-1 infection is required for optimal infectivity, we cannot rule out the possibility that the synergy in the infectious potential that we have observed in the presence of Nef (Fig. 5) is solely due to Nef-mediated CD4 endocytosis, since it has been shown that Nef can contribute to viral infectivity in a CD4-independent manner (45).

In conclusion, we confirm here that one important role of CD4 down-modulation is to permit the release of fully infectious virions, since excessive levels of CD4 molecules at the cell surface and in nascent viral particles has dramatic consequences on viral infectivity. Two HIV-1 proteins, Nef and Vpu, counteract this inhibition by down-modulating the cell surface expression of CD4 and, as a consequence, have synergistic effects on viral infectivity.

Acknowledgments—We thank X.-J. Yao for advice, excellent technical suggestions, and comments on the manuscript; E. Tiganos and V. Lecourtier for helpful discussions; and E. Simoneau for the SVCMV-CD4ΔCDR2 construct. We also thank A. Ostiguy and F.

Deshaies for assistance with FACS analysis and figure preparation. Finally, we thank R.-P. Sekaly and J. Lama for kindly providing the pMNC-CD4ΔCDR2 plasmid and Jurkat (CD4⁺ and high-CD4) cell lines, respectively. HeLa-CD4-LTR-β-gal, 1G5, anti-gp41 hybridoma cells, anti-gp120 monoclonal antibodies, and the pNL4.3 proviral clone were obtained from M. Emerman, E. Aguilar-Cordova, G. K. Lewis, K. Ugen, and D. Weiner, respectively, through the AIDS Research and Reference Reagent Program.

REFERENCES

- Miceli, M. C., and Parnes, J. R. (1993) *Adv. Immunol.* **53**, 59–122.
- Moore, J. P. (1996) *AIDS* **4**, 297–305.
- Cullen, B. R. (1998) *Cell* **95**, 685–692.
- Doms, R. W., and Trono, D. (2000) *Genes Dev.* **14**, 2677–2688.
- Aiken, C., Konner, J., Landau, N. R., Lenburg, M. E., and Trono, D. (1994) *Cell* **76**, 853–864.
- Chen, B. K., Gandhi, R. T., and Baltimore, D. (1996) *J. Virol.* **70**, 6044–6053.
- Garcia, J., and Miller, A. (1991) *Nature* **350**, 508–511.
- Figuet, V., Gu, F., Foti, M., Demareux, N., Gruenberg, J., Carpentier, J. L., and Trono, D. (1999) *Cell* **97**, 63–73.
- Schwartz, O., Dautry-Varot, A., Gaud, B., Marechal, V., Subtil, A., Heard, J. M., and Dumas, O. (1995) *J. Virol.* **69**, 528–533.
- Crise, B., Buoncicore, L., and Rose, J. K. (1990) *J. Virol.* **64**, 5585–5593.
- Kawamura, I., Kogi, Y., Oh-Hori, N., Onodera, K., Kimura, G., and Nonato, K. (1989) *J. Virol.* **63**, 3748–3754.
- Stevenson, M., Meier, C., Mann, A., Chapman, N., and Wasiak, A. (1988) *Cell* **53**, 483–496.
- Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A., and Strebel, K. (1992) *J. Virol.* **66**, 226–234.
- Cohen, E. A., Terwilliger, E. F., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1988) *Nature* **334**, 532–534.
- Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G., and Wain-Hobson, S. (1990) *Nature* **345**, 356–358.
- Schwartz, S., Felber, B. K., Fenyl, E.-M., and Pavlakis, G. N. (1990) *J. Virol.* **64**, 5448–5456.
- Strebel, K., Klimkait, T., Maldarelli, F., and Martin, M. A. (1989) *J. Virol.* **63**, 3784–3791.
- Terwilliger, E. F., Cohen, E. A., Lu, Y.-C., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5163–5167.
- Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A., and Strebel, K. (1992) *J. Virol.* **66**, 7193–7200.
- Bour, S., Schubert, U., and Strebel, K. (1995) *J. Virol.* **69**, 1510–1520.
- Marguttin, F., Bour, S. P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, D., and Benarous, R. (1998) *Mol. Cell.* **1**, 565–574.
- Schubert, U., Anton, L. C., Bauck, L., Cox, J. H., Bour, S., Bannink, J. R., Orłowski, M., Strebel, K., and Yewdell, J. W. (1998) *J. Virol.* **72**, 2280–2288.
- Bour, S., Perrin, C., and Strebel, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 33800–33806.
- Cortes, M., Wong-Staal, F., and J., L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 1770–1779.
- Lama, J., Mangasarian, A., and Trono, D. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 622–631.
- Ross, T. M., Oran, A. E., and Cullen, B. R. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 613–621.
- Kimpton, J., and Emerman, M. (1992) *J. Virol.* **66**, 2232–2239.
- Aguilar-Cordova, E., Chinen, J., Donohue, L., Lewis, D. E., and Belmont, J. W. (1994) *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**, 295–301.
- Yao, X.-J., Moulard, A. J., Subramanian, R. A., Forget, J., Rougeau, J., Bergeron, D., and Cohen, E. A. (1998) *J. Virol.* **72**, 4712–4720.
- Fleury, S., Lamarre, D., Meloche, S., Ryu, S. E., Contin, C., Hendrickson, W. A., and Sekaly, R. P. (1991) *Cell* **66**, 1037–1049.
- Friborg, J., Ladha, A., Göttinger, H., Haseltine, W. A., and Cohen, E. A. (1995) *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **8**, 10–22.
- Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., and Martin, M. A. (1986) *J. Virol.* **59**, 284–291.
- Gratton, S., Yao, X. J., Venkatesan, S., Cohen, E. A., and Sekaly, R. P. (1996) *J. Immunol.* **157**, 3305–3311.
- Abacioglu, Y., Fouts, T., Laman, J., Claassen, E., Pincus, S., Moore, J., Roby, C., Kamin-Lewis, R., and Lewis, G. (1994) *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**, 371–381.
- Diekey, C., Ziegler, U., Agadjanyan, M., Srikanthan, V., Refaelli, Y., Prabhu, A., Sato, A., Williams, W., Weiner, D., and Ugen, K. (2000) *DNA Cell Biol.* **19**, 243–252.
- Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K. J., Starcich, B., Josephs, S. F., Doran, E. R., Rafalski, J. A., Whitehorn, E. A., Baumeister, K., Ivanoff, L., Petteway, S. R., Pearson, M. L., Lautenberger, J. A., Papas, T. S., Ghayeb, J., Chang, N. T., Gallo, R. C., and Wong-Staal, F. (1985) *Nature* **313**, 277–284.
- Yao, X.-J., Friborg, J., Chercunne, F., Gratton, S., Boisvert, F., Sekaly, R. P., and Cohen, E. A. (1995) *Virology* **209**, 615–623.
- Schubert, U., Clouse, K. A., and Strebel, K. (1995) *J. Virol.* **69**, 7699–7711.
- Yao, X. J., Göttinger, H., Haseltine, W. A., and Cohen, E. A. (1992) *J. Virol.* **66**, 5119–5126.
- Benson, R. E., Sanfridson, A., Ottinger, J. S., Doyle, C., and Cullen, B. R. (1993) *J. Exp. Med.* **177**, 1561–1566.
- Palese, P., Tobita, K., Ueda, M., and Compans, R. W. (1974) *Virology* **61**, 397–410.
- Gunuluru, S., Kinsey, M. C., and Emerman, M. (2000) *J. Virol.* **74**, 10882–10891.
- Rowell, J. F., Ruff, A. L., Guarnieri, F. G., Staveley-O'Carroll, K., Lin, X., Tang, J., August, J. T., and Siliciano, R. F. (1995) *J. Immunol.* **155**, 1818–1828.
- Greenberg, M. E., Brunson, S., Lock, M., Neumann, M., Pavlakis, G. N., and Skowronski, J. (1997) *EMBO J.* **16**, 6964–6976.
- Chowers, M. Y., Pandori, M. W., Spina, C. A., Richman, D. D., and Gantelli, J. C. (1995) *Virology* **212**, 461–467.

ANNEXE 2

CD4 dimers constitute the functional component required for T cell activation.

Moldovan, M. C., Yachou, A., **Levesque, K.**, Wu, H., Hendrickson, W. A., Cohen,
E. A. and Sekaly, R. P. 2002.
Journal of Immunology **169** :6261-8.

CD4 Dimers Constitute the Functional Component Required for T Cell Activation¹

Maria-Cristina Moldovan,^{2*†} Abdelkader Yachou,^{2*#} Karine Lévesque,[‡] Hao Wu,[¶] Wayne A. Hendrickson,^{||} Eric A. Cohen,[‡] and Rafick-Pierre Sékaly^{3*†§}

The CD4 molecule plays a key role in the development and activation of helper T cells. Dimerization and oligomerization is often a necessary step in the function of several cell surface receptors. Herein, we provide direct biochemical evidence confirming the presence of CD4 as dimers in transfected cells from hemopoietic and fibroblastic origin as well as in primary T cells. Such dimers are also observed with murine CD4 confirming selective pressure during evolution to maintain such a structure. Using a series of point mutations, we have precisely mapped the dimerization site at residues K318 and Q344 within the fourth extracellular domain of CD4. These residues are highly conserved and their mutation results in interference with dimer formation. More importantly, we demonstrate that dimer formation is essential for the coligand and coreceptor functions of CD4 in T cell activation. These data strongly suggest that CD4 dimerization is necessary for helper T cell function. *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 6261–6268.

The CD4 molecule is composed of an N-terminal extracellular portion, a transmembrane part and a short cytoplasmic tail. This molecule plays an important role in the development and the activation of T cells by increasing the affinity/avidity of TCR for the peptide/class II molecule of MHC II and/or by transducing signals through the associated tyrosine kinase p56^{lck} (1–4). The extracellular part of CD4 consists of four domains (D1–D4) with Ig-like structures and is involved in the interaction with class II molecules of the MHC and other ligands (1, 2, 5).

Previous reports have suggested that CD4 may exist as a dimer. Several of the CD4 ligands have been described as multimers, including MHC II as a dimer of $\alpha\beta$ heterodimers, the chemoattractant factor IL-16 as a homotrimer, and the HIV gp160 as a trimer (6–10). Moreover, the superdimer in the crystal structure of the human class II DR1 isotype can hypothetically interact with two CD4 molecules (11). Additionally, we have reported that both sides of CD4 are involved in CD4-mediated T cell activation, suggesting that one side of CD4 may play a role in MHC II interaction, while the other side may be involved in CD4 self-association (12).

In 1997, the crystal structure of the four extracellular domains of human CD4 has been determined. It shows that CD4 molecules can form dimers through the D4 domain (13). This is clearly different from the conclusion proposed by others who have used peptide analogs to show that CD4 dimerizes through the CDR3 loop of its membrane distal domain D1. Others, using chimeras of CD4 and CD2 have suggested that D3 and D4 could mediate CD4 dimer formation (10, 14–16). Dimers of CD4 have recently been demonstrated on the surface of lymphocytic cell lines, in lysates from primary T cells and from lymphocytic and monocytic cell lines (17). However, these reports have not addressed the functional importance of these dimers nor have they identified the CD4 dimerization site (17).

Herein, we confirm the presence of CD4 dimers on the surface of T cells and we provide direct evidences that residues in the D4 domain, present at the dimer interface as shown in the crystal, are required for dimer formation. More interestingly, we clearly demonstrate that CD4 dimerization is required for CD4-mediated T cell activation.

Materials and Methods

Cells

A2.01 is a human CD4 negative T cell line, generated by limiting dilution of the A3.01 variant of the CEM T cell line (18). MA15 cells were generated by stable transfection of the A2.01 cells with wild-type (WT)⁴ CD4 as described below. KR3 is a CD4 negative murine T cell hybridoma whose TCR is specific to the male Ag H-Y (19). 3DT52.5.8 is a murine CD4 negative T cell hybridoma obtained by single-cell cloning of 3DT52.5 hybridoma (20–22). DAP-D⁴, DAP-D⁴DR4, and DAP-DR1 were generated by stably transfecting DAP-3 cells (12, 23) with the gene encoding the murine MHC class I isotype D⁴ alone or together with cDNAs encoding the α - and β -chains of the human class II isotypes DR4 or with cDNA encoding the isotype DR1, respectively (12, 24).

Antibodies

L-68 and OKT4 are mouse mAbs specific to human CD4 (12, 23). The rabbit anti-human CD4 polyclonal serum was a gift of Dr. A. Truneh (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, King of Prussia, PA). H129 is a rat anti-murine CD4 mAb (25). The rabbit anti-hemagglutinin (HA) polyclonal Ab Y-11 was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), and the mouse anti-glutamic acid-proline (EP) mAb CLP001A

*Laboratoire d'Immunologie, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Québec, Canada; [†]Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montréal, Québec, Canada; [‡]Laboratoire de Retrovirologie humaine, and [§]Laboratoire d'Immunologie, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; [¶]Department of Biochemistry, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY 10021; ^{||}Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY 10032; and [#]Université Hassan II, Faculté des Sciences, Casablanca, Morocco.

Received for publication May 13, 2002. Accepted for publication September 19, 2002.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by grants from the National Cancer Institute of Canada (NCIC7273; to R.-P.S.), from the Canadian Institute for Health Research (HOP-13999; to R.-P.S.) and (HOP-14228; to E.A.C.), and from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (to R.-P.S. and E.A.C.). M.-C.M. was supported by a scholarship from the Fonds pour la Recherche en Santé du Québec. R.-P.S. and E.A.C. are recipients of Canada Research Chairs.

² M.-C.M. and A.Y. contributed equally to this work.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. Rafick-Pierre Sékaly, Laboratoire d'Immunologie, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, CP 6128, Succursale Center-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

⁴ Abbreviations used in this paper: WT, wild type; IAA, iodoacetamide; NEM, N-ethylmaleimide; SEB, staphylococcus enterotoxin B; HA, hemagglutinin; EP, glutamic acid-proline; sCD4, surface CD4.

from Cedarlane Laboratories (Hornby, Ontario, Canada). KJ12 is an mAb specific to the D^d alloantigen-specific TCR (12). The mouse F23.1 mAb is specific to the mouse TCR bearing V β 8 and was provided by Dr. A. Veilleux (McGill Cancer Center, Montreal, Quebec, Canada; Ref. 26). Abs anti-human Fc, DR, and NK were prepared in our laboratory from the hybridoma IV.3, D1.12, and 129, respectively (American Type Culture Collection, Manassas, VA). The CD8-specific Ab was purchased from Pierce (Rockford, IL); the peroxidase-conjugated anti-rabbit Ab was from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Bar Harbor, ME); the anti-mouse Ig was from Pierce; and anti-rat Ig was from Santa Cruz Biotechnology.

Western blot analysis

Cell pellets were lysed in 0.5% digitonin (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), 150 mM NaCl, 20 mM triethanolamine, and 1 mM EDTA. Laemmli sample buffer lacking SDS and 2-ME (60 mM Tris (pH 6.8), 20 μ g/ml bromophenol blue, and 6% glycerol) was added to the supernatant. Whole-cell lysates were then fractionated in 9% SDS-PAGE gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Blots were probed with the CD4-specific polyclonal Ab, followed by peroxidase-conjugated anti-rabbit Ab or with the CD4-specific mAb L-68 followed by peroxidase-conjugated anti-mouse Ab. Blots were then developed using ECL (NEN, Guelph, Ontario, Canada) and autoradiography (Eastman Kodak, Rochester, NY).

Cell metabolic labeling and immunoprecipitation

Forty-eight hours post transfection (27) of the eukaryotic expression vector SVCMV expressing WT CD4 or mutated (C4202A) CD4 and/or WT p56^{lck} (28, 29), COS-7 cells were cultured in methionine- and cysteine-free DMEM media (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA); then, the translabel mix ([³⁵S]methionine and [³⁵S]cysteine 200 μ Ci; ICN Pharmaceuticals) was added for 5 h. Immunoprecipitations were conducted on cell lysates using OKT4 hybridoma supernatant in the presence of protein A-Sepharose beads, then resuspended in nondenaturing and nonreducing Laemmli buffer and fractionated in 8% SDS-PAGE gels. Dried gels were autoradiographed. Alternatively, total cellular proteins were prepared in 0.5% digitonin and protein inhibitors mixture (2 mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptin, and 0.1 μ M pepstatin). Protein G-Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech) were incubated with rabbit anti-IL2 polyclonal Ab Y-11, and immunoprecipitations were then conducted by adding the coupled Y-11 Ab to the cell lysate supernatants. Immunoprecipitates were resuspended in denaturing, but nonreducing Laemmli buffer to prevent the dissociation of the Ig chains H and L, and then resolved in 9% SDS-PAGE gels. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech) and blotted with the mouse anti-EP mAb CLP001A (10 μ g/ml) or the mouse anti-CD4 mAb L-68 (1 μ g/ml) followed by anti-mouse peroxidase-conjugated secondary Ab and developed using ECL and autoradiography.

Generation of cells expressing tagged CD4 or mutant CD4 molecules

The CD4-tagged molecules were generated by PCR using a pair of oligonucleotides corresponding to the complementary coding sequences for the HA epitope (TGAATTACAGGCTTGCGTAGTCTGGTACATCGTATGGATACCCGGGAATGGGCTACATGTCTT) or a 6-fold repeat of the EP motif (TGAATTCAAGGTTTCAGGTTCTGGTTCAGGTTCTGGTTCCTGGCTCCCGGGAATGGGCTACATGTCTT). Mutagenesis was confirmed by dideoxy sequencing. The cDNAs encoding the tagged molecules were then cloned into the eukaryotic expression vector SR α neomycin (30) and used to transfect A2.01 cells by electroporation (18). The dimerization mutants were made by overlapping PCR, introduced into the SR α -puromycin vector (30), and transfected into A2.01 and 3DT52.5.8 cells (18, 20–22) as described previously (12). Stable transfectants were generated by adding the selection agent, puromycin (Sigma-Aldrich) or G-418 (Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada), at concentrations of 0.8 μ g/ml and 1.5 mg/ml, respectively.

Preparation of CD4⁺ T cells

Peripheral blood PBMCs were isolated from human blood by Ficoll gradient (Amersham Pharmacia Biotech). Peripheral blood collection from healthy human volunteers was obtained following approval of institutional ethical review board. CD4⁺ T cells were then purified by negative selection using Abs specific to Fc, DR, NK, and CD8 according to the manufacturer's recommendations (Pierce columns). The purity of the CD4⁺ population was then tested by staining with Simultest CD4/CD8 (BD Biosciences, Mountain View, CA) and flow cytometry analysis. Purity of sorted populations was always >90% CD4⁺ T cells.

Stimulation of T cells and measurement of IL-2 production

The coligand and coreceptor assays have been described previously (12, 23). After overnight incubation at 37°C, supernatants were then harvested and levels of IL-2 production were assessed using the IL-2-dependent cell line CTLL.2 and the hexosaminidase colorimetric assay as previously described (23).

Determination of EC₅₀ ratio

These ratios were calculated as described previously (12). In brief, EC₅₀ were determined as the amount of staphylococcus enterotoxin B (SEB) resulting in the half maximal response of stimulated T cells as measured by IL-2 production. The log concentrations of SEB used were plotted on the x-axis and the corresponding IL-2 production on the y-axis. Curve fitting was then performed using the Sigma Plot program (Jandel Scientific, San Rafael, CA). The EC₅₀ ratios were calculated according to the following formula: EC₅₀ obtained for cells expressing mutant CD4/EC₅₀ obtained for cells expressing WT CD4.

Results

Homodimers of CD4 are present on the cell surface of T cells

We developed a biochemical assay to assess the presence of CD4 dimers in A2.01 CD4-transfected T cells (18). Following gentle cell lysis and sample preparation in the absence of SDS and 2-ME, immunoblots with either CD4-specific polyclonal or mAb (L-68) Abs enabled us to detect two bands with approximate molecular mass (m_r) of 55 and 110 kDa, corresponding to the estimated sizes of monomeric and dimeric forms of CD4 (Fig. 1A and data not

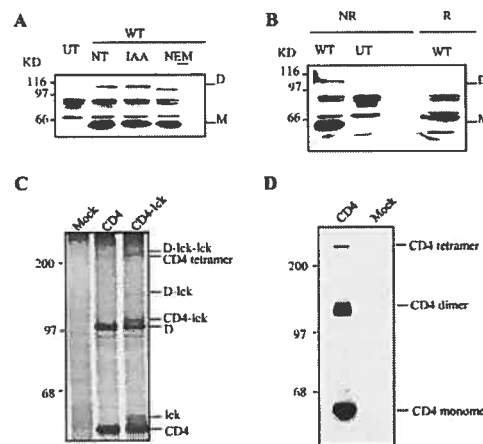


FIGURE 1. CD4 molecules exist as monomers, dimers, and tetramers. Cell pellets were lysed with 0.5% digitonin and analyzed by Western blot using a CD4-specific polyclonal Ab. Lanes are as follows. *A*, Untransfected (UT) or transfected A2.01 cells with WT CD4 (WT) untreated (NT) or treated with the sulfhydryl blocking reagents 10 mM IAA (IAA) or 8 mM NEM (NEM). *B*, UT or transfected A2.01 cells with WT CD4 (WT) whose total lysates were prepared using Laemmli buffer containing neither SDS nor β-ME (NR) or containing 2% SDS and 1% 2-ME (R). *C*, COS-7 cells were transiently transfected with control plasmid (Mock), SVCMC CD4wt (CD4) or cotransfected with SVCMC CD4wt and SVCMV p56^{lck} (CD4-lck). Cell labeling and immunoprecipitations with the anti-CD4 mAb OKT4 were conducted as described in *Materials and Methods*. The mobilities (in kilodaltons) of molecular mass markers are indicated to the left of the autoradiogram. *D* refers to dimer; *M* refers to monomer. *D*, COS-7 cells were transfected with SVCMV-CD4wt (CD4) or control plasmid (Mock). Forty-eight hours posttransfection, cells were lysed in digitonin buffer and cellular lysate immunoprecipitated with anti-CD4 mAbs. Immunocomplexes were separated by gel electrophoresis using nondenaturing conditions, transferred to nitrocellulose, and analyzed by Western blot using a rabbit polyclonal anti-CD4 Ab.

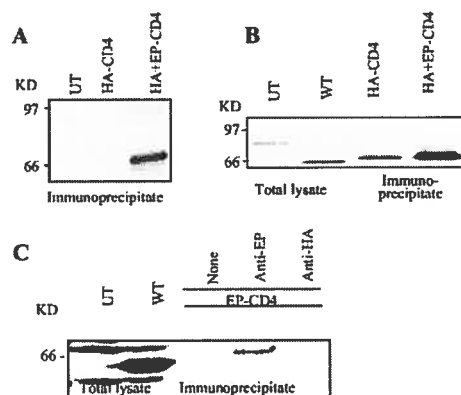


FIGURE 2. CD4 molecules form homodimers. *A*, Immunoprecipitations, with the HA-specific Ab Y-11 followed by Western blot using the anti-EP mAb CLP001A, on lysates from A2.01 untransfected (UT) or transfected with HA-tagged CD4 alone (HA-CD4) or together with EP-tagged CD4 (HA+EP-CD4). *B*, Western blot using the CD4-specific mAb L-68 and total lysates of A2.01 (UT) or MA15 (WT), the anti-HA immunoprecipitate from the lysates of A2.01 transfected with HA-tagged CD4 alone (HA-CD4), or together with EP-tagged CD4 (HA+EP-CD4). *C*, Western blot using anti-CD4 polyclonal Ab and total lysate of A2.01 cells untransfected (UT) or transfected with WT CD4 (WT). Immunoprecipitates obtained from lysates of A2.01 cells transfected with EP-tagged CD4 using protein G-Sepharose beads alone (None), the anti-EP mAb (Anti-EP), or the anti-HA polyclonal Ab (Anti-HA).

shown). The L-68 mAb maps to the CDR1 and CDR3 loops of D1 of CD4 (23); it does not bind the dimerization site and hence should not affect CD4 self-association. As expected, CD4 molecules migrate faster under these conditions than in reducing and denaturing conditions (Fig. 1*B*). A similar pattern was obtained in COS-7 cells transfected with CD4, demonstrating that CD4 oligomer formation occurs in the absence of lymphocyte-specific proteins (Fig. 1, *C* and *D* and data not shown). The OKT4 mAb used in this study to immunoprecipitate CD4 complexes maps to the D3 domain and does not encompass the dimerization site; notably, OKT4 was shown to inhibit homodimerization of soluble recombinant CD4 molecules, but not of membrane-bound CD4 molecules (17). Interestingly, upon cotransfection of CD4 with p56^{lck}, additional bands corresponding to CD4 dimers associated with one *lck* molecule (*D-lck*) or with two *lck* molecules (*D-lck/lck*) were observed. These protein bands were not detected when a mutant CD4 that is unable to bind *lck* was cotransfected (Fig. 1, *C* and *D* and data not shown). CD4 dimerization is not due to nonspecific interactions through free cysteines, as demonstrated by the detection of this dimer even in the presence of the alkylating reagents iodoacetamide (IAA) or *N*-ethylmaleimide (NEM) (Fig. 1*A*). The small difference in migration of dimers following treatment with IAA and NEM could be due to differences in their interaction with thiol groups within CD4, which could induce different structural constraints on CD4 dimers. Two additional bands, migrating at ~70 and 85 kDa that appear in some blots are most likely to be unspecific since they are also observed in lysates of untransfected cells (Figs. 3*B*, and 5, *A* and *B*, and data not shown).

To demonstrate that the ~110-kDa band corresponds to the CD4 homodimer, two constructs involving the C-terminal addition to CD4 of the influenza HA epitope or the EP repeat were generated and stably cotransfected into A2.01 cells (31). Immunoprecipitations with the HA-specific polyclonal Ab Y-11 followed by

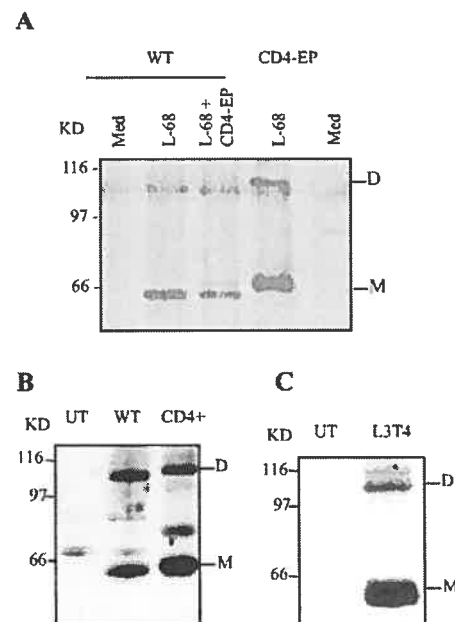


FIGURE 3. CD4 dimers are present on the cell surface of transfected cells, in primary T cells, and are conserved across species. *A*, A2.01 cells transfected with WT CD4 (MA15) (WT) or EP-tagged CD4 (EP-CD4) were treated with either medium (NT) or the CD4 specific mAb L-68 (L-68). After washing out unbound Ab, cells were lysed and immunoprecipitations with protein G-Sepharose beads were performed as described for Fig. 2*B*. In lane L-68/EP, after incubation with the CD4-specific mAb L-68 and washing out unbound Ab, the cells were lysed in the presence of 5-fold excess amounts, as measured by cell equivalence, of lysates prepared from EP-CD4⁺ cell expressing similar levels of CD4 molecules. Subsequently, immunoprecipitations with protein G-Sepharose beads were performed as described for Fig. 2*B*. The immunoprecipitates were then analyzed by Western blot as described in Fig. 1*A*. *B*, Western blot was conducted, as in Fig. 1*A*, on total proteins prepared from A2.01 cells (UT), MA15 cells (WT), or from primary CD4⁺ T cells (CD4⁺). *C*, Cells from the KR3 T cell hybridoma untransfected (UT) or transfected with the murine CD4, L3T4 (L3T4) were lysed and analyzed by Western blot as described above except that we used the L3T4-specific mAb H129 followed by peroxidase-conjugated anti-rat Ab for blot revelation.

Western blot with the EP repeat-specific mAb CLP001A revealed a band corresponding to the EP-tagged CD4, indicating the formation of a complex that includes EP and HA-tagged CD4 molecules (Fig. 2*A*). Control Western blots performed using the CD4-specific mAb L-68, detected CD4 in immunoprecipitates from both transfectants (Fig. 2*B*). Furthermore, HA-tagged CD4 molecules transfected into A2.01 cells were not revealed by the CLP001A mAb (Fig. 2*A*). Finally, a signal was observed only in the immunoprecipitate obtained with anti-EP mAb when lysates from cells expressing EP-CD4 were used for immunoprecipitation with protein G Sepharose alone or complexed to either anti-EP or anti-HA Abs followed by Western blot with a CD4-specific polyclonal Ab (Fig. 2*C*). Altogether, these results demonstrate that CD4 can form homodimers and that these dimers migrate at ~110 kDa.

To demonstrate that CD4 dimers are present on the cell surface, intact A2.01 WT CD4⁺ transfectants were first incubated with the CD4-specific mAb L-68, and then lysed and cell surface immunocomplexes analyzed by Western blot using a rabbit polyclonal

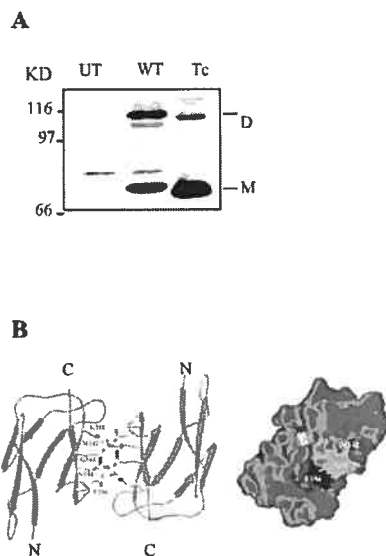


FIGURE 4. Identification of the CD4 dimerization site. *A*, Total cell lysates from untransfected (UT) or transfected A2.01 cells with WT CD4 (WT) or CD4 deleted in its cytoplasmic portion (Tc) (41) were analyzed by Western blot as described in Fig. 1*A*. *B*, *left*, Ribbon diagram of the D4 domain dimer structure, in red and blue, respectively, looking down the 2-fold axis. The side chains of dimer-interface residues are shown. *Right*, Molecular surface of the D4 protomer in red, rotated by 90 degrees along y -axis. Dimer-interface residues are labeled.

anti-CD4 Ab. Results of a representative experiment ($n = 3$) are illustrated in Fig. 3*A* and clearly show the presence of cell surface CD4 monomers (band at ≈ 55 kDa) and cell surface CD4 dimers (band at ≈ 110 kDa) (Fig. 3*A*). We performed the following experiment to ensure that the surface-bound Ab does not bind any intracellular material released postlysis and that all Ab sites are saturated following their binding to the cell surface CD4 molecule. We took advantage of the fact that we had generated EP-tagged CD4 molecules and incubated lysates of cells expressing such molecules with immunoprecipitates of cell surface CD4. A 5-fold excess of lysates from cells expressing EP-CD4 was used in these experiments. The advantage of using such molecules resides in the fact that they can be easily distinguished from WT CD4 by their molecular mass or from binding to Abs specific to the EP-tag (Fig. 2, *B* and *C* and data not shown no. 2). If Ab sites were not saturated by cell surface CD4 molecules, they would then interact with the excess of EP-tagged CD4 molecules. This should result in the presence of bands migrating at molecular mass corresponding to EP-tagged CD4 when immunoprecipitations of WT CD4 are conducted in the presence of excess EP-tagged CD4. Results of Fig. 3*A* clearly show the presence of two bands migrating at ≈ 55 and 110 kDa only (Fig. 3*A*). They fail to demonstrate the presence of EP-tagged CD4 molecules. These results provide an unambiguous demonstration that the CD4 molecules observed in our experimental conditions correspond to cell surface CD4 (Fig. 3*A*). Specificity of the experiment is provided by the absence of any detectable bands in WT CD4⁺ or EP-CD4⁺ cells put in the presence of media alone or CD4-negative cells treated with media or the L-68 mAb (Fig. 3*A* and data not shown).

A similar analysis was performed on purified human CD4⁺ T cells to confirm that this finding could be extended to physiolog-

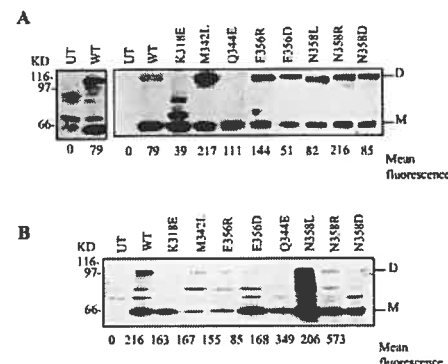


FIGURE 5. Biochemical analysis of the CD4 dimerization site. *A*, Western blot as described in Fig. 1*A* on total proteins from A2.01 cells untransfected (UT) or transfected with either WT CD4 (WT) or different CD4 mutants. Each mutant is designated by the letter symbol of the amino acid followed by the number of its position in the CD4 sequence and the substituted residue. Mean fluorescence values obtained by flow cytometry for each CD4 transfectant are indicated below the corresponding transfectant. *B*, Western blot as described in Fig. 1*A* on total proteins from 3DTS2.5.8 cells untransfected (UT) or transfected with either WT CD4 (WT) or different CD4 mutants. Each mutant is designated by the letter symbol of the amino acid followed by the number of its position in the CD4 sequence and the substituted residue. Mean fluorescence values obtained by flow cytometry for each CD4 transfectant are indicated below the corresponding transfectant. *C*, Sequence alignment of primary structure of CD4 molecules originating from different species including human (H), rat (R), mouse (M), rabbit (Rb), cat (C), chimpanzee (Ch), and rhesus macaque (Rh). Shown are residues between S316 and K360, and those present at the dimerization site are boldface.

ically relevant T cell subsets. Results of these experiments show that CD4 dimers are present on primary CD4⁺ T cells. A small difference in the migration pattern of CD4 molecules was observed in CD4⁺ T cells from some donors ($n = 3$) when compared with transfected cells (Fig. 3*B* and data not shown). This could reflect differences in CD4 glycosylation.

Strong conservation of amino acid sequences of human and murine CD4 (55%) led to suggest that murine CD4 could also dimerize. Using similar experimental conditions to those detailed in Fig. 1*A*, lysates from the KR3 T cell hybridoma transfected with murine CD4 were analyzed. As shown in Fig. 3*C*, the immunoblot, using the mouse CD4 specific mAb H129, also reveals the presence of the ≈ 55 and 110 kDa forms of CD4, indicating that murine CD4 also homodimerizes. The fact that this homodimerization is conserved through evolution clearly infers the functional relevance of CD4 dimers (Fig. 3*C*).

Characterization of the CD4 dimerization site

To determine the respective contribution of the extracellular and intracellular domains of CD4 to dimer formation in our assay, we

Table 1. Serological analysis of CD4 dimerization mutants

mAbs ^a	CD4 Mutants ^b								
	WT	K318E	M342L	Q344E	E356R	E356D	N358L	N358R	N358D
Leu3a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-68	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-206	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B66.6.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-93	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OKT4B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OKT4A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MT408	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OKT4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Q425	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OKT4E	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OKT4D	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MT-427	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-120	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-117	+	+/-	-	-	+/-	+/-	-	+/-	+

^aMurine T cell hybridoma cell line 3DT52.5.8 expressing human CD4 WT or mutant CD4, was subjected to immunofluorescent with all of the Abs listed here at concentration saturating for the CD4WT. Analyses were carried out with FACScan flow cytometer. Results were calculated as follows: $[(\text{mt FL (mAb)} - \text{mt FL (neg)}) / (\text{mt FL (Leu3a)} - \text{mt FL (neg)})] / [(\text{WT FL (mAb)} - \text{WT FL (neg)}) / (\text{WT FL (Leu3a)} - \text{WT FL (neg)})]$. FL indicates mean fluorescence value; mt, a given CD4 mutant; WT, the WT CD4; neg, the negative control. Symbols for binding are: +, >50%; +/-, 30 to 50%; -, <30%.

^bMutants are indicated by the name of the residue (one-letter amino acid code) and its position on the sequence, followed by the name of the substituting residue.

first generated cells expressing CD4 molecules deleted in the cytoplasmic domain and analyzed them as described in Fig. 1A (Fig. 4A). Results obtained show that truncated forms of CD4 retain the ability to form dimers, although to a lesser extent than the WT CD4 molecules. This finding confirms the data of surface CD4 (sCD4) crystal structure implying a major contribution of the extracellular domains of CD4 to dimer formation and suggesting a minor, stabilizing role of the cytoplasmic domain (13).

To precisely define the dimerization site of CD4, we generated a series of point mutations of the residues present in the predicted interface of the CD4 dimer, as deduced from the crystal structure of CD4 (13) (Fig. 4B). As illustrated in Fig. 4B, five residues within D4 are located within the CD4 dimer interface. Mutations that lead to conservative substitutions (E356D) or changes in residues charge (K318E, Q344E, E356R, N358R, and N358D) or their hydrophobicity (M342L and N358L) were made and stably transfected into the A2.01 cell line. Populations expressing comparable levels of cell surface CD4 were selected. The ability of

these mutants to dimerize was tested as described in Fig. 1A. Representative results from a series of reproducible experiments ($n = 3$) in two different cell lines show that mutations involving residues K318 (K318E) and Q344 (Q344E) clearly abrogate the capacity of CD4 to dimerize (Fig. 5, A and B). However, all the other mutants form dimers demonstrating that residues K318 and Q344 are those critical for dimer formation. We should point out that among the five mutated residues, only K318 and Q344 are conserved among at least seven species (human, mouse, rat, rabbit, cat, chimpanzee, and macaque Rhesus monkeys) (Fig. 5C) further confirming the evolutionary pressure to maintain this structure and clearly suggesting its importance (32–35). Results obtained in Fig. 3C with murine CD4 do indeed support this hypothesis.

Dimers are the functional moieties of the enhancement by CD4 of T cell activation

We then assessed the importance of CD4 dimers in T cell activation. Biochemical analysis of CD4 mutants transfected into the

Table II. Characterization of CD4 dimerization mutants

Mean Fluorescence ^a		Epitopes ^b			Mean Fluorescence ^a		Stimulation (EC ₅₀ ratio mt/wt) ^c	
Cells	Leu3a	C	A	L	KJ12	F23.1	KJ12	F23.1
CD4 ⁺	0							
WT	216.1	15	0	0	19.8	29.4	0.3	0.8
K318E	163.3	14	1	0	9.7	22.4	0.3	0.8
M342L	167.7	14	0	1	21.6	37.9	0.3	0.9
Q344E	168.3	14	0	1	13.2	18.1	0.5	0.7
E356R	155	14	1	0	17.7	32.5	0.3	0.8
E356D	85.1	14	1	0	21.6	42.6	0.2	0.9
N358L	349.2	14	0	1	16.1	33.6	0.3	0.8
N358R	206.6	14	1	0	19.3	22.8	0.4	0.5
N358D	573.3	15	0	0	11.2	13.7	0.3	0.5

^aThe surface expression levels of CD4 and TCR were determined by flow cytometry using Leu3a and KJ12 or F23.1, respectively, and are presented as mean fluorescence values.

^bThe structure of the CD4 mutants was analyzed by staining them with 15 CD4 specific mAbs directed against the four extracellular domains (Leu3a, L-68, L-206, B66.6.1, L-93, OKT4B, OKT4A, MT408, OKT4, Q425, OKT4E, OKT4D, MT-427, L-120, and L-117). The number of conserved (C), affected (A), or lost (L) epitopes is indicated.

^cThe stimulations by the anti-TCR mAbs KJ12 and F23.1 are presented here as EC₅₀ ratios calculated as described previously (23).

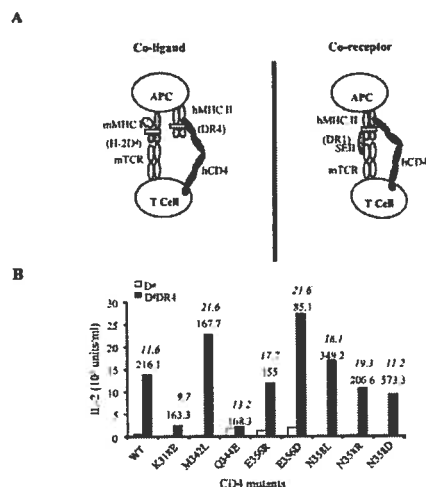
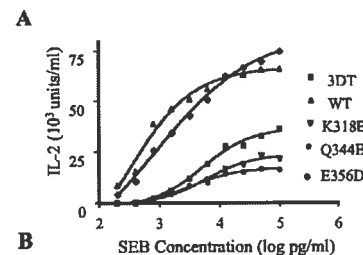


FIGURE 6. Dimer formation is required for CD4 coligand function. **A**, Schematic representation of the two functions of CD4 in the 3DT cell system, coligand vs coreceptor. In the coligand system, CD4 and TCR bind to different classes of MHC molecules. The TCR recognizes the class I cognate alloantigen H-2D^d while the CD4 interacts with the class II MHC molecule HLA-DR4. In the coreceptor system, the TCR and CD4 can both bind to the class II molecule HLA-DR1 in the presence of the bacterial superantigen SEB. In both systems, the interaction of CD4 with the class II molecules enhances the T cell response. **B**, IL-2 production by 3DT52.5.8 cells expressing WT CD4 or different CD4 mutants when cocultured with DAPD^d (□) or DAPD^dDR4 cells (■). Mean fluorescence intensity values obtained by staining with the anti-TCR mAb KJ12 (italic) or the CD4 specific mAb Leu3a (Roman) and analysis by flow cytometry are noted on the top of each transfectant column.

CD4⁻ murine T cell hybridoma 3DT52.5.8 confirms that, as in Fig. 4B, only K318E and Q344E show impaired capacity to form dimers (Fig. 5B). Flow cytometric analysis indicates that the overall structure of these mutants is well maintained since most epitopes, recognized by a panel of 15 anti-CD4 mAbs specific for residues distributed along the four extracellular domains of CD4, are conserved (Table I). Transfectants were selected to express comparable levels of cell surface CD4 and TCR and to respond with similar efficacy to stimulation with anti-TCR Abs KJ12 and F23.1 (Table II).

In the coligand assay, interaction of WT CD4 with its ligand HLA-DR leads to a significant enhancement of IL-2 production when the TCR recognizes its nominal Ag H-2D^d (21-fold) (Fig. 6B) (12, 23). Two independently derived populations of each transfectant were tested ($n = 3$). Representative results are presented in Fig. 6B. They show that mutants K318E and Q344E can no longer enhance IL-2 production in the presence of D^d and HLA-DR4. In contrast, cells expressing all other CD4 mutants show similar pattern of reactivity to cells expressing WT CD4 (10- to 40-fold of enhancement in IL-2 production in the presence of HLA-DR4) (Fig. 6B). These results indicate that CD4 dimerization is critical for the coligand function of CD4.

In the coreceptor assay, the DAP-DR1 transfectant was used to present SEB to the Vβ8⁺ 3DT52.5.8 T cell hybridoma TCR (12). The level of IL-2 production in response to SEB stimulation and the SEB concentration required to obtain the half-maximal response (EC₅₀) were determined for each CD4 mutant (12). Cells transfected with mutants K318E or Q344E as well as CD4⁻



Cells	SEB stimulation (EC ₅₀ ratio mt/wt)	Max IL-2 production (10 ³ units/ml)
CD4 ⁻	9.3	35.6
WT	1	64.2
K318E	8.6	23.5
Q344E	5.4	17
E356D	1.6	75.6

FIGURE 7. Dimer formation is required for CD4 coreceptor function. **A**, T cell hybridomas were stimulated by increasing concentrations of SEB presented by HLA-DR1 expressed on DAP-3 cells. **B**, Maximal IL-2 level produced by each transfectant in response to SEB stimulation.

3DT52.5.8 cells produce significantly lower levels of IL-2 (5-fold), even at the highest concentrations of SEB, when compared with transfectants bearing WT CD4. A control mutant that can still dimerize, E356D, produces comparable levels of IL-2 as the WT CD4 transfectant (Fig. 7, A and B). These data indicate that CD4 dimerization is also necessary for the coreceptor function of CD4. Altogether, these results clearly demonstrate that CD4 dimers constitute the critical moiety required for T cell activation.

Discussion

Dimerization has been described for a wide variety of transmembrane receptors (36). In this report, we clearly show that monomeric and dimeric forms of CD4 do coexist on the surface of both CD4-transfected and primary T cells. The involvement of CD4 oligomers in MHC class II binding and/or T cell activation has been previously suggested, but not proven, by a panoply of crystallographic studies (13, 37), molecular modeling studies (reviewed in Ref. 10), functional studies (11, 15, 24, 38), and inhibition of IL-2 production using synthetic peptides (39, 40). In addition, CD4 oligomerization has been reported to be critical for an efficient interaction of CD4 with other ligands, such as gp160 or IL-16 (6–10, 41). Moreover, residues within the dimerization site have been shown to be essential for both IL-16 binding and lymphocyte activation (41). Direct evidence for the presence of oligomeric forms of human CD4 in lymphoid and monocytoid cells was provided by Cunningham and colleagues (17). Our finding supports and extends this latter report (17). Using specific point mutations, we identify K318 and Q344, two highly conserved residues within the D4 domain, as critical for CD4 dimer formation, thus confirming the result of the sCD4 crystal structure where those residues are clearly at the interface of the CD4 dimer (13). More importantly, our study demonstrates that such dimers constitute the functional component of CD4 in T cell activation.

Dimerization of CD4 cannot be attributed to nonspecific interactions between free cysteines since treatment with either IAA or NEM does not interfere with the formation of dimers (Fig. 1A). The finding that the mutation of a single residue can abrogate CD4 dimer formation suggests that self-association of CD4 is of low affinity and could explain difficulties encountered in detecting CD4

dimers biochemically when classical analytical methods are used. Q344 is highly conserved among species and is present at the center of the CD4 dimer interface. This residue forms an H-bond with the symmetrically related Q344. K318 is also very conserved during evolution and may form a salt bridge with E356 (32–35). CD4 dimerization could not be observed in the cocrystal of CD4 with MHC class II, since the CD4 component included only the two N-terminal domains of CD4. Arguing against CD4 dimerization, this recent study has reported that alanine substitutions of residues K318 and Q344 are without effect on CD4-MHC II binding, measured by rosette formation between CD4-transfected COS-7 cells and MHC II-expressing Raji cells (42). There are several possible explanations for these findings: 1) overexpression of CD4 molecules in COS-7 cells might facilitate cell-cell adhesion and thus bypass the need for CD4 dimerization in rosette formation; and 2) CD4 dimerization might be required only for T cell activation, when the TCR recognizes its nominal Ag on the MHC. The latter hypothesis is supported by previous studies that showed that CD4 accumulation at the immunological synapse is dependent on TCR binding and/or signaling (Ref. 43, and M.-C. Moldovan, unpublished observations).

The unexpected result obtained with the E356R mutation, which does not have any effect on dimer formation, can be explained by the presence of E320 in its vicinity, which leaves the possibility for the formation of a salt bridge between residues R356 and E320. Dimers involving the mutation of residue N358 lead to a slightly different migration pattern when compared with WT CD4 (Fig. 5, *A* and *B*). Indeed, the N358L substitution results in a faster migration rate of this dimer, while the N358D substitution has the opposite effect. As for mutant N358R, it migrates at the same rate as WT. Interestingly, basic residues are found at this position in all other species (Fig. 5C). These differences in migration patterns could be due to the effect of mutations on compactness of dimers. Thus, the substitution of N358 for the hydrophobic amino acid leucine would promote its interaction with residues in its vicinity, thereby increasing the compactness of the resulting dimers and allowing their faster migration. With the knowledge that the CD4-associated tyrosine kinase p56^{lck} can dimerize, our results also demonstrate that CD4 homodimerizes mainly through its extracellular domains, especially the D4 domain, and that CD4 dimers are not a result of the p56^{lck} dimerization (44). This idea is confirmed by our observation that in T cells CD4 truncated in its cytoplasmic portion conserves its ability to dimerize (Fig. 4A). Moreover, in the COS-7 cell reconstitution system, we show that CD4 dimers can be observed in the absence of p56^{lck} and that a mutant CD4 that fails to associate with p56^{lck} retains its dimerization ability (Fig. 1C) (45). Similar findings have been previously reported by Lynch et al. (17) using peptides encompassing sequences within the cytoplasmic portion of CD4. Although believing that the extracellular D4 domain is the key player in CD4 dimerization, we cannot rule out a stabilizing effect provided by the associated p56^{lck} kinase (Fig. 4A). According to the crystal structure of sCD4, it has been suggested that p56^{lck} trans autophosphorylation could ensue the dimerization of CD4 (13). The fact that CD4 dimers can associate with two p56^{lck} molecules further confirms the possibility that CD4 dimerization could lead to p56^{lck} trans phosphorylation (Fig. 4A).

We also show that dimerization is required for CD4 functions as a coligand of the TCR where CD4 and TCR interact with distinct MHC II ligands on APCs and as a coreceptor where the same MHC II molecule is recognized by both TCR and CD4. There are many examples in the literature reporting that dimerization is required for the function of receptors, including receptors for growth factors, cytokines, and TCR (46–48). Indeed, prior crystallographic, biochemical, and functional data have indicated the ne-

cessity of coreceptor dimerization for an efficient TCR/Ag/MHC interaction and subsequent full T cell activation. In fact, the CD8 coreceptor molecule is expressed on the T cell surface as either $\alpha\alpha$ homodimers or $\alpha\beta$ heterodimers (49). More importantly, it has been reported that the affinity of the TCR for its specific ligand is enhanced through a decreased "off" rate in the presence of either CD8 $\alpha\alpha$ homodimers or $\alpha\beta$ heterodimers (50). Thus, the CD8 dimers may modulate TCR/Ag/MHC interactions (51).

The CD4 coreceptor molecule crystallizes as a dimer (13) and its functional significance could be explained by earlier observations reporting that the interaction between CD4 and MHC II is observed only when CD4 molecules are oligomeric (immobilized on matrix), but not monomeric (in solution) (38, 52). In that context, it is important to note that dimers of MHC II constitute the minimal oligomer size necessary for T cell activation (53).

Recently, video microscopic analyses of interactions between T cells and APCs indicate that formation of a stable central cluster within the immunological synapse is a critical event for T cell activation (43, 54). In that context, it has been shown that CD4 is important for the triggering of synapse formation between T cells and APCs, while in the later stages CD4 is excluded from the central core of the synapse. Interestingly, the recruitment of CD4 at the synapse seems to depend solely on its extracellular part (43). Although the CD4 molecule does not appear to be involved in the initial recognition by the TCR of specific peptide-MHC complexes, its association at the synapse is essential in allowing activation of Ag-specific T cells, probably by augmenting the T cell contact with the APC and by facilitating receptor cross-linking at the contact junction. As a matter of fact, a recent study has demonstrated that CD4 allows efficient recruitment of p56^{lck} and the transient autophosphorylation of lck at the synapse (55). In light of these experiments, it can be inferred that in our system, either monomeric or dimeric forms of CD4 are being recruited to the engaged TCR/Ag/MHC complexes. It can be surmised that because of their different avidities, dimers only would persist much longer in their interaction with MHC molecules as compared with monomers and would allow the formation of a stable immunological synapse and the induction of a complete stimulatory signal, resulting in IL-2 production. Indeed, it has been recently shown that monomeric CD4 possesses poor peptide-MHC binding ($K_d = 200 \mu\text{M}$) with no detectable affinity for the TCR, leading to the hypothesis that the weak monomeric CD4-MHC affinity could be overcome by augmenting the avidity of the interaction through CD4 dimerization/oligomerization (56). The latter hypothesis could explain our findings that only cells bearing CD4 molecules that can form dimers produce IL-2 upon antigenic stimulation. Also, lack of detection of the dimeric form correlates with the loss of physiological activity of the CD4 molecule (Figs. 5B, 6B, and 7, *A* and *B*). We show in this study that there is a basal level of CD4 dimers in the absence of any ligand. Upon the transition of the TCR/Ag/MHC II/CD4 to the center of the synapse, more CD4 molecules may dimerize. This would lead to efficient initial TCR signaling allowing for the formation of the mature immunological synapse and the subsequent full T cell activation and effector functions (57, 58). Altogether, these data suggest that dimerization of CD4 is a critical event in T cell activation.

Acknowledgments

We thank F. Erard for the discussions and critical comments on this manuscript, B. Lauzon for the tagged CD4 constructs, and N. Tessier for her expertise in cell sorting.

References

1. Miedel, M. C., and J. R. Parnes. 1993. Role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Adv. Immunol.* 53:59.

2. Doyle, C., and J. L. Strominger. 1987. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 330:256.
3. Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak, and J. B. Bolen. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}. *Cell* 55:301.
4. Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak, L. E. Samelson, and J. B. Bolen. 1989. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}. *Nature* 338:257.
5. Maddon, P. J., D. R. Littman, M. Godfrey, D. E. Maddon, L. Chess, and R. Axel. 1985. The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell* 42:93.
6. Center, D. M., J. S. Berman, H. Kornfeld, A. C. Theodore, and W. W. Cruikshank. 1995. The lymphocyte chemoattractant factor. *J. Lab. Clin. Med.* 125:167.
7. Center, D. M., H. Kornfeld, and W. W. Cruikshank. 1996. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol. Today* 17:476.
8. Brown, J. H., T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, L. J. Stern, R. G. Urban, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen (HLA-DR1). *Nature* 364:33.
9. Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim. 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89:263.
10. Li, S., T. Satoh, R. Kornfeld, and Z. Huang. 1998. CD4 dimerization and oligomerization: implications for T-cell function and structure-based drug design. *Immunol. Today* 19:455.
11. König, R., X. Shen, and R. N. Germain. 1995. Involvement of both major histocompatibility complex class II α and β chains in CD4 function indicates a role for ordered oligomerization in T cell activation. *J. Exp. Med.* 182:779.
12. Huang, B., A. Yachou, S. Fleury, W. A. Hendrickson, and R. P. Sekaly. 1997. Analysis of the contact sites on the CD4 molecule with class II MHC molecule: co-ligand versus co-receptor function. *J. Immunol.* 158:216.
13. Wu, H., P. D. Kwong, and W. A. Hendrickson. 1997. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* 387:527.
14. Langedijk, J. P., W. C. Puijk, W. P. van Hoern, and R. H. Melen. 1993. Location of CD4 dimerization site explains critical role of CDR3-like region in HIV-1 infection and T-cell activation and implies a model for complex of coreceptor-MHC. *J. Biol. Chem.* 268:16875.
15. Sakihama, T., A. Smolyar, and E. L. Reinherz. 1995. Oligomerization of CD4 is required for stable binding to class II major histocompatibility complex proteins but not for interaction with human immunodeficiency virus gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6444.
16. Zhang, X., D. Piatier-Tonneau, C. Auffray, R. Murali, A. Mahapatra, F. Zhang, C. C. Maier, H. Sarigovi, and M. I. Greene. 1996. Synthetic CD4 exocyclic peptides antagonize CD4 coreceptor binding and T cell activation. *Nat. Biotechnol.* 14:472.
17. Lynch, G. W., A. J. Sloane, V. Raso, A. Lai, and A. L. Cunningham. 1999. Direct evidence for native CD4 oligomers in lymphoid and monocytic cells. *Eur. J. Immunol.* 29:2590.
18. Folks, T., D. M. Powell, M. M. Lightfoot, S. Bann, M. A. Martin, and A. S. Fauci. 1986. Induction of HTLV-III/LAV from a nonvirus-producing T-cell line: implications for latency. *Science* 231:600.
19. Kanagawa, O., and R. Maki. 1989. Inhibition of MHC class II-restricted T cell response by Lyt-2 alloantigen. *J. Exp. Med.* 170:901.
20. Gay, D., P. Maddon, R. Sekaly, M. A. Talle, M. Godfrey, E. Long, G. Goldstein, L. Chess, R. Axel, and J. Kappler. 1987. Functional interaction between human T-cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen. *Nature* 328:626.
21. Greenstein, J. L., J. Kappler, P. Marrack, and S. J. Burackoff. 1984. The role of L3T4 in recognition of Ia by a cytotoxic, H-2D^b-specific T cell hybridoma. *J. Exp. Med.* 159:1213.
22. Rosoff, P. M., S. J. Burackoff, and J. L. Greenstein. 1987. The role of the L3T4 molecule in mitogen and antigen-activated signal transduction. *Cell* 49:845.
23. Fleury, S., D. Lamarre, S. Meloche, S. E. Ryu, C. Cantin, W. A. Hendrickson, and R. P. Sekaly. 1991. Mutational analysis of the interaction between CD4 and class II MHC: class II antigens contact CD4 on a surface opposite the gp120-binding site. *Cell* 66:1037.
24. Fleury, S., B. Huang, A. Zerbib, G. Croteau, E. O. Long, and R. P. Sekaly. 1996. Mutations in human CD4 impair the functional interaction with different human and mouse class II isotypes and alleles. *J. Immunol.* 156:1848.
25. Pierres, A., P. Naquet, A. van Agthoven, F. Bekkhouche, F. Denizot, Z. Mishal, A. M. Schmitt-Verhulst, and M. Pierres. 1984. A rat anti-mouse T4 monoclonal antibody (H129.19) inhibits the proliferation of Ia-reactive T cell clones and delineates two phenotypically distinct (T4⁺, Lyt-2,3⁺, and T4⁺, Lyt-2,3⁻) subsets among anti-Ia cytolytic T cell clones. *J. Immunol.* 132:2775.
26. Stierz, U. D., H. G. Rammensee, J. D. Benedetto, and M. J. Bevan. 1985. Characterization of a murine monoclonal antibody specific for an allootypic determinant on T cell antigen receptor. *J. Immunol.* 134:3994.
27. Lamarre, D., A. Ashkenazi, S. Fleury, D. H. Smith, R. P. Sekaly, and D. J. Capon. 1989. The MHC-binding and gp120-binding functions of CD4 are separable. *Science* 245:743.
28. Gratton, S. M., Julius, and R. P. Sekaly. 1998. Lck-independent inhibition of T cell antigen response by the HIV gp120. *J. Immunol.* 161:3551.
29. Berube, P., B. Barbeau, R. Cantin, R. P. Sekaly, and M. Tremblay. 1996. Repression of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat-driven gene expression by binding of the virus to its primary cellular receptor, the CD4 molecule. *J. Virol.* 70:4009.
30. Takebe, Y., M. Seiki, J. Fujisawa, P. Hoy, K. Yokota, K. Arai, M. Yoshida, and N. Arai. 1988. SR α promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* 8:466.
31. Richardson, J. P., R. P. Beecroft, D. L. Tolson, M. K. Liu, and T. W. Pearson. 1988. Procyclin: an unusual immunodominant glycoprotein surface antigen from the procyclic stage of African trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 31:203.
32. Muddon, P. J., S. M. Molineaux, D. E. Maddon, K. A. Zimmermann, M. Godfrey, F. W. Alt, L. Chess, and R. Axel. 1987. Structure and expression of the human and mouse T4 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9155.
33. Clark, S. J., W. A. Jeffries, A. N. Barclay, J. Gagnon, and A. F. Williams. 1987. Peptide and nucleotide sequences of rat CD4 (W3.25) antigen: evidence for derivation from a structure with four immunoglobulin-related domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1649.
34. Hogue, B. F., S. Sawashikosol, T. J. Brown, K. Lee, D. P. Recker, and T. J. Kindt. 1992. CD4 and its role in infection of rabbit cell lines by human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7963.
35. Camerini, D., and B. Seed. 1990. A CD4 domain important for HIV-mediated syncytium formation lies outside the virus binding site. *Cell* 60:747.
36. Lemmon, M. A., and J. Schlessinger. 1994. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.* 19:439.
37. Brady, R. L., E. J. Dodson, G. G. Dodson, G. Lange, S. J. Davis, A. F. Williams, and A. N. Barclay. 1993. Crystal structure of domains 3 and 4 of rat CD4: relation to the NH2-terminal domains. *Science* 260:979.
38. Weber, S., and K. Karjalainen. 1993. Mouse CD4 binds MHC class II with extremely low affinity. *Int. Immunol.* 5:695.
39. Li, S., J. Gao, T. Satoh, T. M. Friedman, E. A. Edling, U. Koch, S. Choksi, X. Han, R. Kornfeld, and Z. Huang. 1997. A computer-screening approach to immunoglobulin superfamily structures and interactions: discovery of small non-peptide CD4 inhibitors as novel immunotherapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:73.
40. Satoh, T., S. Li, T. M. Friedman, R. Wiaderekiewicz, R. Kornfeld, and Z. Huang. 1996. Synthetic peptides derived from the fourth domain of CD4 antagonize CD4 function and inhibit T cell activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224:438.
41. Liu, Y., W. Cruikshank, T. O'Loughlin, P. O'Reilly, D. M. Center, and H. Kornfeld. 1999. Identification of a CD4 domain required for IL-16 binding and lymphocyte activation. *J. Biol. Chem.* 274:23387.
42. Wang, J., R. Meyers, J. Liu, T. Sakihama, R. Zhang, A. Joachimak, and E. L. Reinherz. 2001. Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10799.
43. Krummel, M. F., M. D. Sjaastad, C. Wulff, and M. M. Davis. 2000. Differential clustering of CD4 and CD3 ζ during T cell recognition. *Science* 289:1349.
44. Eck, M. J., S. K. Atwell, S. E. Shocloson, and S. C. Harrison. 1994. Structure of the regulatory domains of the Src-family tyrosine kinase Lck. *Nature* 368:764.
45. Tremblay, M., S. Meloche, S. Gratton, M. A. Wainberg, and R. P. Sekaly. 1994. Association of p56^{lck} with the cytoplasmic domain of CD4 modulates HIV-1 expression. *EMBO J.* 13:774.
46. Heldin, C. H. 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80:213.
47. Reich, Z., J. J. Boniface, D. S. Lyons, N. Borochov, E. J. Wachtel, and M. M. Davis. 1997. Ligand-specific oligomerization of T-cell receptor molecules. *Nature* 387:617.
48. Ullrich, A., and J. Schlessinger. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203.
49. Ellmeier, W., S. Sawada, and D. R. Littman. 1999. The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 17:523.
50. Garcia, K. C., C. A. Scott, A. Brunmark, F. R. Carbone, P. A. Peterson, I. A. Wilson, and L. Teyton. 1996. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class molecule complexes. *Nature* 384:577.
51. Luescher, I. F., E. Vivier, A. Layer, J. Mahiou, F. Godeau, B. Malissen, and P. Romero. 1995. CD8 modulation of T-cell antigen receptor-ligand interactions on living cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 373:353.
52. Cammarota, G., A. Schirle, B. Takacs, D. M. Doran, R. Knorr, W. Bannwarth, J. Guardiola, and F. Smigaglia. 1992. Identification of a CD4 binding site on the H2 domain of HLA-DR molecules. *Nature* 356:799.
53. Boniface, J. J., J. D. Rabinowitz, C. Wulff, J. Hampl, Z. Reich, J. D. Altman, R. M. Kantor, C. Beeson, H. M. McConnell, and M. M. Davis. 1998. Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands. *Immunity* 9:459.
54. Grakour, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285:221.
55. Holdorf, A. D., K. H. Lee, R. Burack, P. M. Allen, and A. S. Shaw. 2002. Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. *Nat. Immunol.* 3:259.
56. Xiong, Y., P. Kern, H. C. Chang, and E. L. Reinherz. 2001. TcR binding to a pMHCII is kinetically distinct from and independent of CD4. *J. Biol. Chem.* 276:5659.
57. Lee, K. H., A. D. Holdorf, M. L. Dustin, A. C. Chan, P. M. Allen, and A. S. Shaw. 2002. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295:1539.
58. van der Merwe, P. A., and S. J. Davis. 2002. The immunological synapse—a multitasking system. *Science* 295:1479.

